

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HİPERTANSİYON TEDAVİSİNDE ETKİLİ
ÇÖZÜNÜRLÜK SORUNU OLAN BİR ETKİN MADDE
ÜZERİNDE ÖNFORMÜLASYON ÇALIŞMALARI**

Ecz. Esra PEZİK

**Farmasötik Teknoloji Programı
DOKTORA TEZİ**

**ANKARA
2022**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**HİPERTANSİYON TEDAVİSİNDE ETKİLİ
ÇÖZÜNÜRLÜK SORUNU OLAN BİR ETKİN MADDE
ÜZERİNDE ÖNFORMÜLASYON ÇALIŞMALARI**

Ecz. Esra PEZİK

Farmasötik Teknoloji Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. İmran VURAL

ANKARA

2022

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİPERTANSİYON TEDAVİSİNDE ETKİLİ ÇÖZÜNÜRLÜK SORUNU OLAN BİR ETKİN
MADDE ÜZERİNDE ÖNFORMÜLASYON ÇALIŞMALARI

Öğrenci: Esra PEZİK

Danışman: Prof. Dr. İmran VURAL

Bu tez çalışması 31.08.2022 tarihinde jürimiz tarafından "Farmasötik Teknoloji Doktora Programı" nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: *Prof. Dr. Selma ŞAHİN*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Canan HASÇİÇEK*
(Ankara Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Sevgi TAKKA*
(Gazi Üniversitesi)

Üye: *Prof. Dr. Sibel PEHLİVAN*
(Hacettepe Üniversitesi)

Üye: *Doç. Dr. Tuğba GÜLSÜN İNAL*
(Hacettepe Üniversitesi)

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

19 Eylül 2022

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. (1)

o Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. (2)

o Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

31 / 08 / 2022

Esra PEZİK

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. İmran VURAL danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.

Ecz. Esra PEZİK

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım boyunca sonsuz sabrı ve sevgisi ile en güzel desteğim ve bilimsel yönü kadar manevi değerleri ile en büyük yol göstericim olan, fikirlerimi destekleyerek beni cesaretlendiren ve beraber çalışmaktan onur duyduğum değerli hocam Sn. Prof. Dr. İmran Vural'a teşekkürü borç bilirim.

Çalışma disiplini ve geniş ufku ile hem bilimsel özverisini hem de insani değerlerini örnek aldığım, akademik gelişim sürecim boyunca çok büyük emek ve katkıları olan, beraber çalışmaktan onur duyduğum kıymetli hocam Sn. Prof. Dr. Selma Şahin'e teşekkürü borç bilirim.

Doktora çalışmalarım boyunca birlikte çalışma fırsatı bulduğum ve ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan değerli hocalarım Doç. Dr. Tuğba Gülsün İnal, Doç. Dr. Miyase Gözde Gündüz, Dr. Öğr. Üyesi Naile Öztürk ve Arş. Gör. Yakup Gültekin'e emekleri ve destekleri için teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımı özgür ve rahat bir çalışma ortamında yürütebilmem için her türlü imkanı sağlayarak, bilime ve araştırmaya teşvik eden Prof. Dr. Levent Öner başta olmak üzere tüm değerli öğretim üyesi/elemanı hocalarıma, araştırma görevlisi ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma ve teknisyenimiz Orhan Çelik'e teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmalarım sürecinde ihtiyaç duyduğum her an yanımda olan, beni her zaman cesaretlendiren ve zor zamanları sevgi ve destekleri ile aştığım değerli dostlarım Dr. Öğr. Gör. Tuğba Çopur ve Arş. Gör. Nagihan Faydalı'ya teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca her türlü fedakarlıkları ile bu günlere gelmemin asıl mimarları olan başta babam Hüseyin Pezik ve annem Hediye Pezik olmak üzere kardeşlerim Özlem Alagöz, Elif Pezik Yakut ve Muhammed Emir Pezik'e ve varlıkları ile dünyamı güzelleştiren yeğenlerim Zeynep Alagöz ve Ömer Alagöz'e teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Pezik, E., Hipertansiyon Tedavisinde Etkili Çözünürlük Sorunu Olan Bir Etkin Madde Üzerinde Önformülasyon Çalışmaları, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Programı Doktora Tezi, Ankara, 2022. Bu tez kapsamında hem L-tipi hem de T-tipi kalsiyum kanallarını bloke etme yeteneğine sahip bir molekül olan M3'ün nanokristal teknolojisi (NKT) ile zayıf çözünürlüğünün iyileştirilmesi ve pullulan bazlı ağızda dağılan film (ADF) formülasyonlarının geliştirilmesi hedeflenmiştir. Çözünürlük ve Caco-2 permeabilite çalışma sonuçları M3'ün Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi'ne (BCS) göre Sınıf 4'de yer alabileceğini göstermiştir. Çöktürme ve ultrasonikasyon yöntemlerinin kombinasyonu ile farklı tür ve oranlarda stabilizan ve kriyoprotektan kullanılarak gerçekleştirilen formülasyon çalışmaları sonucunda optimum nanokristal formülasyonu (%5 trehaloz ile dondurularak kurutulmuş %0,5 poloksamer 188 ile hazırlanan nanosüspansiyon; $320,2 \pm 15,3$ nm, $-27,4 \pm 0,1$ mV) belirlenmiştir. Optimum nanokristal formülasyonu ve çözücü dökme yöntemine göre hazırlanan ADF formülasyonları çeşitli fizikokimyasal çalışmalar (XRD, DSC, FT-IR, SEM) ile analiz edilmiş ve sonuçlar M3'ün kristal halden amorf yapıya dönüştüğünü göstermiştir. Kısa süreli hızlandırılmış stabilite çalışmaları ile pullulan bazlı ADF formülasyonlarının 4 hafta boyunca fiziksel stabilitesini koruduğu tespit edilmiştir. M3 nanokristalleri ile M3'ün çözünme profili iyileştirilirken, çözünürlüğünde yaklaşık 200 kat ve permeabilitesinde yaklaşık 30 kat artış elde edilmiştir. Farklı kanser hücre hatları (Caco-2, MCF-7, SK-BR-3, A549) üzerinde yapılan hücre kültürü çalışmaları, M3 ve M3 nanokristallerinin anlamlı bir sitotoksik etkiye sahip olmadığını göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Ağızda dağılan filmler, biyofarmasötik sınıflandırma sistemi, çözünürlük ve permeabilite, dihidropiridin türevleri, nanokristal teknolojisi

Destekleyen Kurumlar: Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi (Proje Numarası: THD-2019-18409) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Pezik, E., Preformulation Studies on an Active Substance with Solubility Problems in the Treatment of Hypertension, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Pharmaceutical Technology Programme, Ph.D Thesis, Ankara, 2022. This thesis aims to improve the poor solubility of M3, a molecule that can block both L-type and T-type calcium channels, with nanocrystal technology (NKT), and to develop orally disintegrating film (ADF) formulations pullulan based. The equilibrium solubility and Caco-2 permeability study results indicated that M3 could be a Biopharmaceutical Classification System (BCS) Class 4 compound. Optimum nanocrystal formulation (nanosuspension prepared with 0.5% poloxamer 188 freeze-dried with %5 trehalose; 320.2 ± 15.3 nm, -27.4 ± 0.1 mV) was determined as a result of formulation studies using different types and ratios of stabilizers and cryoprotectants by the combination of precipitation and ultrasonication methods. The optimum nanocrystal formulation and the ADF formulation prepared by the solvent casting method were analyzed by various physicochemical studies (XRD, DSC, FT-IR, SEM) and the results showed that M3 transformed from crystalline to amorphous structure. Short-term accelerated stability studies were shown that pullulan-based ADF formulation maintain their physical stability for 4 weeks. Dissolution rate, solubility (200 times), and permeability (30 times) of M3 were improved and increased by preparing M3 nanocrystals compared to raw M3. The cell culture studies on different cancer cell lines (Caco-2, MCF-7, SK-BR-3, A549) showed that M3 and M3 nanocrystals did not have a significant cytotoxic effect.

Key Words: Orally disintegrating films, biopharmaceutics classification system, solubility and permeability, dihydropyridine derivatives, nanocrystal technology

Supporting Institution: This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project Number: THD-2019-18409).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
ŞEKİLLER	xvii
TABLolar	xxi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Hipertansiyon Tanı ve Tedavisi	5
2.2. Antihipertansif İlaçların Oral Biyoyararlanımını Kısıtlayan Faktörler ve Biyoyararlanımlarının Artırılmasına Yönelik Genel Stratejiler	7
2.2.1. Çözünürlük	11
2.2.2. Partisyon Katsayısı	14
2.2.3. Presistemik Eliminasyon	15
2.2.4. P-glikoprotein Aracılı İletim Sistemi	15
2.2.5. İlacın Gastrointestinal Sistem Fizyolojisinden Etkilenmesi	16
2.3. Antihipertansif İlaçların Oral Biyoyararlanımının Artırılması İçin Kullanılan Nanotaşıyıcı Sistemler	17
2.4. Mikronizasyon ve Nanonizasyon	23
2.5. Nanokristal Teknolojisi	25
2.5.1. Nanokristal Teknolojisinde Stabilizasyon	27
2.5.2. Nanokristal Teknolojisinde Kullanılan Stabilizanlar	29
2.5.3. Nanokristallerin Kurutulması	37
2.5.4. Nanokristal Hazırlama Teknolojileri	41
2.6. Kalsiyum Kanal Blokörleri ve Etki Mekanizmaları	50
2.6.1. 1,4-Dihidropiridin Türevleri	53

2.7. M3'ün Sentezi ve M3'e Ait Bilgiler	54
2.8. Ağızda Dağılan Film Formülasyonları	56
2.8.1. Ağızda Dağılan Film Formülasyonlarının Üstünlükleri ve Sakıncaları	57
2.8.2. Ağızda Dağılan Film Formülasyonları'nda Kullanılan Yardımcı Maddeler	60
2.8.3. Ağızda Dağılan Film Formülasyonlarının Hazırlanması	62
3. GEREÇ VE YÖNTEM	65
3.1. Gereçler	65
3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	65
3.1.2. Kullanılan Biyolojik Maddeler	67
3.1.3. Kullanılan Cihazlar	67
3.2. Yöntemler	70
3.2.1. M3, Nanosüspansiyon, Nanokristal ve Ağızda Dağılan Film Formülasyonları'nın Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar	70
3.2.2. Çözünürlük Çalışmaları	74
3.2.3. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları	75
3.2.4. M3'ün İn Vitro Miktar Tayin Yöntemi'nin Geliştirilmesi ve Validasyon Çalışmaları	76
3.2.5. Nanokristal Formülasyonu Hazırlanmasında Kullanılacak Yöntem ve Formülasyon Bileşenlerinin Belirlenmesi	80
3.2.6. Ağızda Dağılan Film Formülasyonlarının Hazırlanmasında Kullanılacak Yöntem ve Formülasyon Bileşenlerinin Belirlenmesi	85
3.2.7. M3-NK İçeren Propilen Glikol Bazlı Ağızda Dağılan Filmlerin Karakterizasyonu	90
3.2.8. Stabilitate Çalışmaları	96
3.2.9. Hücre Kültürü Çalışmaları	97
3.2.10. İstatistiksel Analizler	105
4. BULGULAR	106
4.1. M3'ün Fizikokimyasal Özelliklerinin Değerlendirilmesi	106
4.1.1. UV Spektrum Analizi	106
4.1.2. Refraktif İndeks Analizi	106
4.1.3. M3'ün Partikül Büyüklüğü Analizi	107

4.1.4. Taramalı Elektron Mikroskop Analizi	108
4.1.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Analizi	108
4.1.6. X-Işını Kırınımı Analizi	109
4.1.7. Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopi (FT-IR) Analizleri	109
4.2. M3 ve M3 Nanokristal Formülasyonu İçin Yapılan Çözünürlük Çalışma Sonuçları	111
4.3. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları	116
4.4. M3'ün İn Vitro Miktar Tayin Yöntemi'nin Geliştirilmesi ve Validasyon Çalışmaları	117
4.4.1. Doğrusallık	117
4.4.2. Duyarlılık	119
4.4.3. Doğruluk	119
4.4.4. Kesinlik	119
4.4.5. Dayanıklılık	122
4.4.6. Özgüllük	122
4.5. Nanokristal Formülasyonu Hazırlanmasında Kullanılacak Yöntem ve Formülasyon Bileşenlerinin Belirlenmesi	124
4.5.1. M3 Nanokristallerinin Hazırlanmasında Kullanılacak Yöntem Parametrelerine İlişkin Önformülasyon Çalışma Sonuçları	124
4.5.2. Farklı Stabilizan Türü ve Oranları Kullanılarak Hazırlanan M3 Nanokristal Formülasyonlarına İlişkin Sonuçlar	125
4.5.3. Farklı Kriyoprotektan Türü ve Oranları Kullanılarak M3 Nanokristal Formülasyonlarının Kurutulmasına İlişkin Sonuçlar	128
4.6. Ağızda Dağılan Film Formülasyonlarının Hazırlanmasında Kullanılacak Yöntem ve Formülasyon Bileşenlerinin Belirlenmesi	131
4.7. M3-NK İçeren Propilen Glikol Bazlı Ağızda Dağılan Filmlerin Karakterizasyonu	132
4.7.1. Kütle Tekdüzeliliği (Ağırlık Değişkenliği) Testi	132
4.7.2. Kalınlık Testi	134
4.7.3. Yüzey pH Testi	135
4.7.4. Nem Tayini	135
4.7.5. İçerik Tekdüzeliliği Testi	135

4.7.6. Mekanik Kontroller	136
4.7.7. Dağılma Testleri	137
4.8. Caco-2 Permeabilite Çalışmalarında Kullanılacak Nanokristal ve Ağızda Dağılan Film Formülasyonlarının Fizikokimyasal Analiz Sonuçları	139
4.8.1. Taramalı Elektron Mikroskop Analizi	139
4.8.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Analizi	142
4.8.3. X-Işını Kırınımı Analizi	147
4.8.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi Analizleri	151
4.9. Stabilite Çalışmaları	162
4.10. Hücre Kültürü Çalışmaları	169
4.10.1. Hücre Kültürü Çalışmaları İçin Hücrelerin Hazırlanması	169
4.10.2. İn Vitro Geçirgenlik (Permeabilite) Çalışmaları İçin Caco-2 Hücrelerinin Hazırlanması	170
4.10.3. M3'ün Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi'ndeki Yerinin Tespiti İçin Yapılan Ön Deneme Sonuçları	171
4.10.4. Farklı Stabilizanların M3 Nanosüspansiyon Formülasyonlarının İn Vitro Sitotoksosite Profili Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	173
4.10.5. M3 Nanokristal Formülasyonlarının Caco-2, MCF-7, SK-BR-3 ve A549 Hücrelerinin İn Vitro Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	176
4.10.6. Nanokristal ve Ağızda Dağılan Film Formülasyonlarının İn Vitro Geçirgenlik (Permeabilite) Çalışma Sonuçları	179
5. TARTIŞMA	184
5.1. M3'ün Fizikokimyasal Özelliklerinin Değerlendirilmesi	184
5.2. M3 ve M3 Nanokristal Formülasyonu İçin Yapılan Çözünürlük Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi	186
5.3. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi	188
5.4. M3'ün İn Vitro Miktar Tayin Yönteminin Geliştirmesi ve Validasyonu	190
5.5. Farklı Yöntem Koşulları ile PVA-M3 Nanokristallerinin Hazırlanmasına İlişkin Yapılan Önformülasyon Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi	192
5.6. Farklı Stabilizan Türü ve Oranları Kullanılarak M3 Nanokristal Formülasyonlarının Hazırlanması	194

5.7. Farklı Kriyoprotektan Türü ve Oranları Kullanılarak M3 Nanosüspansiyon Formülasyonlarının Kurutulması	196
5.8. Ağızda Dağılan Film Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu	198
5.9. Caco-2 Permeabilite Çalışmalarında Kullanılan Nanokristal ve Ağızda Dağılan Film Formülasyonlarının Fizikokimyasal Özelliklerinin Değerlendirilmesi	206
5.9.1. Taramalı Elektron Mikroskop Analizi	206
5.9.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Analizi	208
5.9.3. X-Işını Kırınımı Analizi	211
5.9.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi Analizleri	213
5.10. Stabilite Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi	215
5.11. Hücre Kültürü Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi	218
5.11.1. M3'ün Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi'ndeki Yerinin Tespit Edilmesi	219
5.11.2. Farklı Stabilizanların M3 Nanosüspansiyon Formülasyonlarının İn Vitro Sitotoksosite Profili Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	221
5.11.3. M3 Nanokristal Formülasyonlarının Caco-2, MCF-7, SK-BR-3 ve A549 Hücrelerinin İn Vitro Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi	222
5.11.4. Nanokristal ve Ağızda Dağılan Film Formülasyonlarının İn Vitro Geçirgenlik (Permeabilite) Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi	223
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	225
7. KAYNAKLAR	229
8. EKLER	
EK-1: Orjinallik Ekran Görüntüsü	
EK-2: Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
a	Ağırlık
g	Gram
h	Hacim
mg	Miligram
µg	Mikrogram
µm	Mikrometre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mm Hg	Milimetre civa
Na	Sodyum
nm	Nanometre

Kısaltmalar

ADF	Ağızda dağılan film
ADT	Ağızda dağılan tablet
API	Aktif farmasötik bileşen
AUC	Eğri altında kalan alan
BCS	Biyofarmasötik sınıflandırma sistemi
BSS	Bağıl standart sapma
CA	Selüloz asetat
Caco-2	İnsan kolorektal adenokarsinoma hücre hattı
C_{maks}	En yüksek kan konsantrasyonu
C_s	Doygunluk çözünürlüğü
DAB	Diaminobütan
DHP	Dihidropiridin
DSC	Diferansiyel taramalı kalorimetre
EDA	Etilendiamin

EMA	Avrupa ilaç ajansı
FaSSIF	Açlık durumunu taklit eden biyouyumlu ortam
FDA	Amerika ilaç ve gıda dairesi
FT-IR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi
HCl	Hidroklorür
HEC	Hidroksi etil selüloz
HPC	Hidroksi propil selüloz
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
HPMC	Hidroksi propil metil selüloz
HT	Hipertansiyon
ICH	Uluslararası uyum konseyi
KKB	Kalsiyum kanal blokörü
LOD	Saptama sınırı
LOQ	Tayin edebilme sınırı
MCC	N-Karboksimetil kitosan
NaCMC	Sodyum karboksi metil selüloz
NKT	Nanokristal teknolojisi
Non-DHP	Dihidropiridin yapısı taşımayan
PAMAM	Poliamidoamin
PB	Partikül büyüklüğü
PCL	Polikaprolakton
PDI	Polidispersite indeksi
PEG	Polietilen glikol
PEO	Polietilen oksit
PG	Propilen glikol
P-gp	P-glikoprotein
PTFE	Politetrafloretillen
PVA	Polivinil alkol
PVP	Polivinil prolidon
SCORE	Sistemik koroner risk değerlendirmesi
SD	Sodyum dokusat
SDC	Sodyum deoksikolat

SEM	Taramalı elektron mikroskop
SH	Standart hata
SLS	Sodyum lauril sülfat
SS	Standart sapma
t_{1/2}	Biyolojik yarı ömür
TEER	Transepitel elektrik rezistansı
TPGS	d-alfa-tokoferil poli (etilen glikol) 1000 süksinat
TRIS	Tris (hidroksimetil) aminometan
USP	Amerikan farmakopesi
UV	Ultraviyole
VK	Varyasyon katsayısı
WHO	Dünya sağlık örgütü
XRD	X-ışını kırınımı
ZP	Zeta potansiyel

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Klinikte sıklıkla kullanılan antihipertansif ilaç grupları ve örnekleri.	7
2.2. Stabilizanların sisteme kararlılık kazandırma mekanizmaları.	29
2.3. Nanokristal hazırlama teknolojileri.	41
2.4. Aşağıdan yukarıya (Bottom-up) teknolojilerinin şematik gösterimi.	43
2.5. Yukarıdan aşağıya (Top-down) teknolojilerinin şematik gösterimi.	45
2.6. M3'ün sentezi.	55
3.1. Refraktif indeks ölçümü.	71
3.2. SEM analizleri sırasında hazırlanan numuneler ve görüntüleme cihazı.	72
3.3. M3 nanosüspansiyonlarının hazırlanmasının şematik gösterimi.	84
3.4. M3 nanokristal formülasyonlarının hazırlanması ve kurutulmasının şematik gösterimi.	85
3.5. M3-NK içeren ADF (M3-ADF) formülasyonunun hazırlanması.	88
3.6. Kalıplara aktarılan sıvı film içeriklerinin görüntüsü.	88
3.7. ADF formülasyonlarının ambalajlanmasında kullanılan materyal (alüminyum folyo).	89
3.8. ADF formülasyonlarının paketlenmesinde kullanılan ambalaj kapatma cihazı.	89
3.9. Kuruma sonrası elde edilen filmlerin görüntüsü ve ambalajlanmış ADF formülasyonu.	90
3.10. ADF formülasyonlarının mekanik kontrollerinde kullanılan cihaz.	94
3.11. Petri kabı yöntemine göre ADF formülasyonlarının dağılma testi.	95
3.12. Damla yöntemine göre ADF formülasyonlarının petri kaplarına yerleştirilmesi.	96
3.13. Damla yöntemine göre ADF formülasyonlarının dağılma testi.	96
4.1. M3'ün metanol:asetonitril:su (35:40:25, h/h/h) çözücü ortamındaki çözeltisine (6,25 µg/mL) ait UV spektrumu.	106
4.2. M3'ün aseton çözücü ortamındaki refraktif indeks ölçüm sonuçlarına ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi.	107
4.3. M3'ün farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri (2500x (a, d), 5000x (b, e) ve 7500x (c, f)).	108
4.4. M3'e ait DSC termogramı.	109
4.5. M3'e ait X-ışını kırınımı difraktogramı.	109
4.6. M3'e ait FT-IR spektrumu.	110

4.7.	M3'ün sudaki çözünürlük değerine ilişkin teorik tahminlerin sonuçları.	111
4.8.	M3'ün farklı çözünme ortamlarındaki çözünürlük profili.	112
4.9.	M3'ün farklı çözünme ortamlarındaki doygunluk çözünürlüğü (Ortalama \pm SS; n=3).	113
4.10.	M3, FK-1 ve M3-NK formülasyonunun çözünürlük profilleri (Ortalama \pm SS; n=3).	116
4.11.	M3 ve optimum formülasyonların 0,01 N HCl ortamındaki in vitro çözünme hızı profilleri (Ortalama \pm SS; n=6).	117
4.12.	M3'ün metanol:asetonitril:su (35:40:25, h/h/h) çözücü ortamındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Ortalama \pm SH; n=6).	118
4.13.	M3'ün metanol:asetonitril:su (35:40:25, h/h/h) çözücü ortamında hazırlanan 50 μ g/mL konsantrasyonundaki çözeltisine ait HPLC kromatogramı.	123
4.14.	M3'ün in vitro miktar tayini için geliştirilen yöntemdeki çözünme ortamına ait HPLC kromatogramı.	123
4.15.	Nanokristal formülasyon bileşimindeki yardımcı maddelerin metanol:asetonitril:su (35:40:25, h/h/h) çözücü ortamında hazırlanan çözeltilerine ait ayrı ayrı HPLC kromatogramları.	124
4.16.	ADF formülasyon bileşimindeki yardımcı maddelerin metanol:asetonitril:su (35:40:25, h/h/h) çözücü ortamında hazırlanan çözeltilerine ait ayrı ayrı HPLC kromatogramları.	124
4.17.	M3-NS'nin partikül büyüklüğü dağılım grafiği.	127
4.18.	M3-NS'nin zeta potansiyel ölçüm grafiği.	127
4.19.	Optimum M3 nanosüspansiyon formülasyonu (M3-NS) ve dondurularak kurutulmuş M3 nanokristal formülasyonu (M3-NK).	128
4.20.	M3-NK'nın partikül büyüklüğü dağılım grafiği.	130
4.21.	M3-NK'nın zeta potansiyel ölçüm grafiği.	130
4.22.	Poloksamer 188'in farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri (200x (a, c) ve 2500x (b)).	140
4.23.	FK-1'in farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri (200x (a, b) ve 2500x (c)).	140
4.24.	FK-2'nin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri (5000x (a), 20.000x (b) ve 50.000x (c)).	140
4.25.	M3-NK'nın farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri (200x (a), 1000x (d), 2000x (e), 2500x (b), 5000x (c, f), 6000x (g) ve 10.000x (h, i)).	141
4.26.	M3-ADF'in farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri (yüzey) (1000x (a, b) ve 10.000x (c)).	141

4.27.	M3-ADF'nin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri (enine kesit) (100x (c), 200x (f), 250x (d, e), 1000x (a, h), 3000x (g) ve 5000x (b)).	142
4.28.	Poloksamer 188'e ait DSC termogramı.	143
4.29.	FK-1'e ait DSC termogramı.	143
4.30.	M3-NK'ya ait DSC termogramı.	144
4.31.	Pullulana ait DSC termogramı.	144
4.32.	FK-2'ye ait DSC termogramı.	145
4.33.	M3-ADF'ye ait DSC termogramı.	145
4.34.	M3, Poloksamer 188, FK-1 ve M3-NK'nın üst üste çakıştırılmış DSC termogramları.	146
4.35.	M3-NK, Pullulan, FK-2 ve M3-ADF'nin üst üste çakıştırılmış DSC termogramları.	146
4.36.	Poloksamer 188'e ait X-ışını kırınımı difraktogramı.	147
4.37.	FK-1'e ait X-ışını kırınımı difraktogramı.	147
4.38.	M3-NK'ya ait X-ışını kırınımı difraktogramı.	148
4.39.	Pullulana ait X-ışını kırınımı difraktogramı.	148
4.40.	FK-2'ye ait X-ışını kırınımı difraktogramı.	148
4.41.	M3-ADF'ye ait X-ışını kırınımı difraktogramı.	149
4.42.	M3, Poloksamer 188, FK-1 ve M3-NK'nın üst üste çakıştırılmış X-ışını kırınımı difraktogramları.	149
4.43.	M3-NK, Pullulan, FK-2 ve M3-NK'nın üst üste çakıştırılmış X-ışını kırınımı difraktogramları.	150
4.44.	Trehaloza ait X-ışını kırınımı piklerinin FK-2'nin X-ışını kırınımı difraktogramı ile üst üste çakıştırılmış görüntüsü.	150
4.45.	Poloksamer 188'e ait FT-IR spektrumu.	152
4.46.	Trehaloza ait FT-IR spektrumu.	153
4.47.	FK-1'e ait FT-IR spektrumu.	154
4.48.	M3-NK'ya ait FT-IR spektrumu.	155
4.49.	Pullulana ait FT-IR spektrumu.	156
4.50.	Aspartama ait FT-IR spektrumu.	157
4.51.	FK-2'ye ait FT-IR spektrumu.	158
4.52.	M3-ADF'ye ait FT-IR spektrumu.	159
4.53.	M3, Poloksamer 188, FK-1 ve M3-NK'nın üst üste çakıştırılmış FT-IR spektrumları.	160

4.54.	M3-NK, Pullulan, FK-2 ve M3-ADF'nin üst üste çakıştırılmış FT-IR spektrumları.	161
4.55.	Kültür ortamı içinde L929, MCF-7, SK-BR-3 ve A-549 hücrelerinin mikrografları (10x).	170
4.56.	İn vitro permeabilite çalışmalarında kullanılan boş ve hücre içeren insert görüntüleri.	171
4.57.	İn vitro permeabilite çalışmalarında kullanılan boş ve hücre içeren insert mikrografları (40x).	171
4.58.	M3'ün ve DMSO kontrollerinin Caco-2 hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksosite profili (Ortalama \pm SH; n=3).	172
4.59.	M3'ün ve %0,5 stabilizan içeren M3 nanosüspansiyon formülasyonlarının 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) inkübasyondan sonra L929 hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksosite profilleri (Ortalama \pm SH; n=3).	175
4.60.	DMSO kontrollerinin L929 hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksosite profilleri (Ortalama \pm SH; n=3).	176
4.61.	Farklı kanser hücreleri üzerinde yapılan in vitro sitotoksosite çalışma profilleri (Ortalama \pm SH; n=3).	178
4.62.	DMSO kontrollerinin farklı kanser hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksosite profilleri (Ortalama \pm SH; n=3).	179
4.63.	İn vitro Caco-2 permeabilite çalışmalarında kullanılacak uygun ilaç dozunun belirlenebilmesi için yapılan in vitro sitotoksosite çalışma profilleri (Ortalama \pm SH; n=3).	181
4.64.	DMSO kontrollerinin Caco-2 hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksosite profilleri (Ortalama \pm SH; n=3).	182
4.65.	İn vitro Caco-2 permeabilite çalışma sonuçlarına göre elde edilen geçirgenlik profilleri (Ortalama \pm SS; n=3).	183

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Oral biyoyararlanım problemi yaşayan bazı antihipertansif ilaçlar ve nedenleri.	9
2.1 Oral biyoyararlanım problemi yaşayan bazı antihipertansif ilaçlar ve nedenleri (Devam).	10
2.2. Antihipertansif ilaçların oral biyoyararlanımının artırılması amacıyla kullanılan bazı nanotaşıyıcı sistemler.	19
2.2. Antihipertansif ilaçların oral biyoyararlanımının artırılması amacıyla kullanılan bazı nanotaşıyıcı sistemler (Devam-1).	20
2.2. Antihipertansif ilaçların oral biyoyararlanımının artırılması amacıyla kullanılan bazı nanotaşıyıcı sistemler (Devam-2).	21
2.2. Antihipertansif ilaçların oral biyoyararlanımının artırılması amacıyla kullanılan bazı nanotaşıyıcı sistemler (Devam-3).	22
2.3. Antihipertansif ilaçların nanokristal bazlı formülasyonlarında kullanılan yöntemler ve formülasyon bileşenleri.	33
2.3. Antihipertansif ilaçların nanokristal bazlı formülasyonlarında kullanılan yöntemler ve formülasyon bileşenleri (Devam-1).	34
2.3. Antihipertansif ilaçların nanokristal bazlı formülasyonlarında kullanılan yöntemler ve formülasyon bileşenleri (Devam-2).	35
2.3. Antihipertansif ilaçların nanokristal bazlı formülasyonlarında kullanılan yöntemler ve formülasyon bileşenleri (Devam-3).	36
2.4. NKT ile üretilmiş ruhsatlı ve faz çalışmaları aşamasında olan ilaçlar.	50
2.5. ADF formülasyonları için potansiyel ilaç adayları.	59
3.1. M3 ve formülasyonların in vitro çözünme hızı çalışmalarında kullanılan koşullar.	76
3.2. M3'ün miktar tayininde kullanılmak üzere geliştirilen kromatografik yöntem koşulları.	77
3.3. Farklı yöntem koşulları kullanılarak hazırlanan PVA-M3 nanokristal formülasyonlarına ait formülasyon parametreleri.	81
3.4. Önformülasyon çalışmalarında kullanılan plasebo film bileşenleri ve oranları.	86
3.5. M3-NK içeren ADF formülasyon bileşenleri ve oranları.	87
3.6. Oromukozal preparatların kütle tekdüzeliği için Avrupa Farmakopesi'nde belirtilen kriterler.	91
3.7. pH 5,7 yapay tükürük sıvısının bileşenleri.	93

3.8.	Asiklovir'in miktar tayininde kullanılan HPLC koşulları.	104
3.9.	Metoprolol tartarat'ın miktar tayininde kullanılan HPLC koşulları.	105
4.1.	M3'ün farklı konsantrasyonlarda saptanan refraktif indeks değerleri (n=3).	107
4.2.	M3'ün farklı çözünme ortamları ve farklı bekletme sürelerine ait çözünürlük sonuçları (Ortalama \pm SS; n=3).	112
4.3.	M3'ün farklı çözünme ortamlarındaki çözünürlük sonuçları.	113
4.4.	M3 için farklı ortamlarda hesaplanan DSV değerleri (Ortalama \pm SH; n=3).	114
4.5.	Varyans analizi tablosu.	114
4.6.	Farklı çözünme ortamlarına ilişkin ikişerli karşılaştırmalar.	115
4.7.	M3, FK-1 ve M3-NK formülasyonunun distile su ortamında yapılan çözünürlük çalışma sonuçları (Ortalama \pm SS; n=3).	115
4.8.	M3 ve optimum formülasyonların 0,01 N HCl ortamında yapılan in vitro çözünme hızı çalışma sonuçları (%Çözünen, %VK; n=6).	116
4.9.	M3'e ait doğrusallık bulguları.	118
4.10.	M3'ün metanol:asetonitril:su (35:40:25, h/h/h) çözücü ortamındaki doğruluk bulguları.	119
4.11.	M3'ün in vitro miktar tayin yöntemine ait tekrarlanabilirlik bulguları.	120
4.12.	M3'ün in vitro miktar tayin yöntemine ait ara kesinlik bulguları (Ortalama \pm SS; n=3).	121
4.13.	M3'ün in vitro miktar tayin yöntemine ait tekrar elde edilebilirlik bulguları (Ortalama \pm SS; n=6).	121
4.14.	M3'ün in vitro miktar tayin yöntemine ait dayanıklılık bulguları (Ortalama \pm SS; n=6).	122
4.15.	Farklı yöntem koşulları ile PVA-M3 nanokristallerinin hazırlanmasına ilişkin yapılan önformülasyon çalışma sonuçları (Ortalama \pm SS; n=6).	125
4.16.	Farklı stabilizan türü ve oranları kullanılarak hazırlanan M3 nanokristallerinin formülasyon çıktıları (Ortalama \pm SS; n=6).	126
4.17.	Farklı kriyoprotektan türü ve oranları kullanılarak hazırlanan M3 nanokristallerinin formülasyon çıktıları (Ortalama \pm SS; n=6).	129
4.18.	Önformülasyon çalışmalarından elde edilen formülasyon parametreleri.	131
4.19.	M3-ADF formülasyonlarının kütle tekdüzeliği bulguları.	133
4.20.	M3-ADF formülasyonlarının kalınlık kontrol tayinine ait bulgular.	134
4.21.	M3-ADF formülasyonlarının yüzey pH ölçümüne ait bulgular.	135

4.22.	M3-ADF formülasyonlarının içerik tekdüzeliği bulguları.	136
4.23.	M3-ADF formülasyonlarının mekanik kontrollerine ait bulgular.	137
4.24.	M3-ADF formülasyonlarının distile su ortamında yapılan dağılma testine ait bulgular.	138
4.25.	M3-ADF formülasyonlarının pH 5,7 yapay tükürük sıvısı ortamında yapılan dağılma testine ait bulgular.	139
4.26.	M3-ADF formülasyonlarının kısa süreli hızlandırılmış stabilite çalışmalarına ait kütle tekdüzeliği bulguları (40°C ± 2°C, %75 nem).	163
4.27.	M3-ADF formülasyonlarının kısa süreli hızlandırılmış stabilite çalışmalarına ait ortalama kalınlık bulguları (40°C ± 2°C, %75 nem).	164
4.28.	M3-ADF formülasyonlarının kısa süreli hızlandırılmış stabilite çalışmalarına ait yüzey pH bulguları (40°C ± 2°C, %75 nem).	165
4.29.	M3-ADF formülasyonlarının kısa süreli hızlandırılmış stabilite çalışmalarına ait ortalama içerik tekdüzeliği bulguları (40°C ± 2°C, %75 nem).	166
4.30.	M3-ADF formülasyonlarının kısa süreli hızlandırılmış stabilite çalışmalarına ait distile su ortamında yapılan dağılma testi bulguları (40°C ± 2°C, %75 nem).	167
4.31.	M3-ADF formülasyonlarının kısa süreli hızlandırılmış stabilite çalışmalarına ait pH 5,7 yapay tükürük sıvısı ortamında yapılan dağılma testi bulguları (40°C ± 2°C, %75 nem).	168
4.32.	M3-ADF formülasyonlarının kısa süreli hızlandırılmış stabilite çalışma bulguları (40°C ± 2°C, %75 nem, Ortalama ± SS).	169
4.33.	M3'ün Caco-2 hücreleri üzerindeki in-vitro sitotoksosite çalışma bulguları (Ortalama ± SH; n=3).	172
4.34.	M3'ün in vitro permeabilite ön çalışma bulguları.	173
4.35.	M3, %0,5 stabilizan içeren M3 nanosüspansiyon formülasyonları ve DMSO kontrollerinin sitotoksosite çalışma bulguları (Ortalama ± SH; n=3).	174
4.36.	Farklı kanser hücreleri üzerinde yapılan sitotoksosite çalışma bulguları (Ortalama ± SH; n=3).	177
4.37.	İn vitro Caco-2 permeabilite çalışmalarında kullanılacak uygun ilaç dozunun belirlenebilmesi için yapılan sitotoksosite çalışma bulguları (Ortalama ± SH; n=3).	180
4.38.	İn vitro Caco-2 permeabilite çalışma bulguları (Ortalama ± SS; n=3).	182

1. GİRİŞ

Hipertansiyon (HT) sürekli kan basıncı yüksekliği ile seyreden ve tüm dünyada sık görülen önemli bir halk sağlığı sorunudur (1-3). HT'un ciddi komplikasyonlara sebep olduğu ve tedavi edilmezse kalp yetersizliği, koroner kalp hastalığı, hemorajik ve trombotik inme, böbrek yetmezliği, periferik arter hastalığı, aort diseksiyonu gibi hastalıklara neden olduğu bilinmektedir. Ayrıca, HT'nun ölüm oranını da artırdığı yapılan çalışmalarla ortaya koyulmuştur (4). HT'u olan yetişkin birey sayısının 2025 yılına kadar, sağlıklı diyet (yüksek sodyum ve düşük potasyum alımı) ve fiziksel aktivite eksikliği gibi yaşam tarzı faktörlerine ve HT farkındalık oranının oldukça düşük olmasına bağlı olarak, artacağı ve dünya çapında yaklaşık 1,5 milyara ulaşacağı tahmin edilmektedir (2, 5, 6). Bu durum, son yıllarda, HT tedavisinde başarı ve farkındalık oranlarının artırılması hususunda yapılan çalışmalara odaklanılması gerekliliğini doğurmuştur (7).

Günümüzde HT'un tedavisinde önerilen yaklaşımlardan biri olan kalsiyum ve potasyum kanallarının modüle edilmesi önemli bir tedavi seçeneğidir. Kalsiyum iyonları; nörotransmitter salımı ve nörolojik etkilerinin yanı sıra, uyarılabilir hücrelerde kasılma gibi birçok anahtar fizyolojik olayın düzenlenmesinde görev almaktadır. Elektriksel olarak uyarılmış bir hücrede, hücre içindeki kalsiyum iyonu düzeyinin artması sonucu damar düz kası kasılmakta ve kan damarları büzülerek kan basıncı artmaktadır. Sürekli kan basıncı yüksekliği de klinikte karşımıza HT olarak çıkmaktadır (8-10).

Kalsiyum kanal blokörleri (KKB), hücre membranında yer alan voltaja bağımlı kalsiyum kanal proteini ve reseptörlerine yüksek bir afiniteyle bağlanmaktadır. KKB ve reseptörlerinin etkileşmesinin doğal bir sonucu olarak hücre içine kalsiyum iyonlarının geçişi engellenmektedir. Hücre içine kalsiyum iyonu girişinin engellenmesi sonucunda ise, kan damarları gevşemekte ve kan basıncı düşmektedir. Uzun süreli kan basıncı yüksekliğini önlemelerinin yanı sıra, daha seyrek ve daha az ortostatik hipotansiyona sebep olmalarından dolayı bu ilaçlar sempatolitik ilaçlara göre; kalp, beyin ve böbrek gibi organların kanlanması yanı sıra diğer bölgelerdeki doku perfüzyonunu azaltmamaları, karbonhidrat ve lipit metabolizmasını olumsuz etkilememeleri gibi üstünlüklere sahiptirler ve bu nedenle

diüretik ve beta blokör grubu ilaçlara tercih edilmektedirler. KBB'ler özellikle hafif ve orta derecedeki primer (esansiyel) HT'nun tedavisinde tek ilaç olarak kullanılabilirler (9, 10). KBB, yapı özelliklerine göre temel olarak üç alt gruba ayrılmaktadır. Bunlar; *1,4-Dihidropiridin (DHP)* türevleri, *fenilalkilamin* türevleri ve *benzodiazepin* türevleridir (11). Bu ilaçlar DHP'ler ve DHP yapısı taşımayanlar (non-DHP) olarak da sınıflandırılmaktadır (12). Bu grubun en önemli üyesi olan DHP türevi ilaçlar, günümüzde angina pectoris ve HT olmak üzere kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde en çok tercih edilen ilaç grubudur (8, 13). DHP türevleri, diğer iki alt gruptan farklı olarak vazoselektif özelliğe sahip olmaları sayesinde kardiyak depresyona neden olmamaktadır (9, 10). Bu gruptaki ilaçlar, farmakolojik etki profili açısından da özellikle kalp ile ilgili bir komplikasyonu olmayan olgularda diğer iki alt grup ilaçlara tercih edilmektedir. Bunlara ek olarak, DHP türevleri yeni başlayan kalp krizinden korunmada yetersiz kalsa da felç vakalarını önemli ölçüde azaltmaktadır. Bu ilaçların "*Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure (JNC 7)*" raporuna göre, sistolik HT hastalarında, özellikle felç riskinin azaltılması amacıyla, ilk ilaç olarak kullanılması önerilmektedir (14).

1,4-DHP'lerin ilk sentezleri Hantzsch tarafından 1882'de yapılmıştır ve grubun prototipi olan nifedipin, 1975 yılında "*Adalat®*" ticari adıyla Bayer firması tarafından Almanya'da tedaviye sunulmuştur (8, 13). Klinikte nifedipin kullanımı ile başarılı sonuçların elde edilmesi, DHP türevleri üzerinde daha yoğun çalışmaların yapılmasını sağlamış olup, toksisitenin azaltılması ve biyoyararlanımın iyileştirilmesi ile daha güvenli ve daha uzun etki süreli yeni kuşak türevlerin araştırılmasına hız vermiştir (15, 16). Amlodipin, isradipin ve nifedipin gibi ticari DHP'ler, farmakolojik etkilerini göstermek için öncelikle L-tipi kalsiyum kanallarını hedeflemektedir (17). DHP yapısı üzerinde yapılan çeşitli modifikasyonlar sonucu DHP halkasının kondanse sistem içerisine alındığı "*hekzahidrokinolin*" türevlerinin ise L-tipi kalsiyum kanallarının yanı sıra farklı fizyolojik fonksiyonlara sahip T-tipi kalsiyum kanalları üzerinde de etkili oldukları gösterilmiştir (18). T-tipi kalsiyum kanalları aldosteron sekresyonunda yer aldığından, tek bir DHP türevi ile hem L- hem de T-tipi kalsiyum kanallarının hedeflenmesi, günümüzde HT'nun daha başarılı bir klinik kontrolü için rasyonel bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir (19, 20). DHP yapı

iskelesini geliştirmeye yönelik çalışmalar, *heksahidrokinolin* halka sistemi içeren ve hem L- tipi hem de T-tipi kalsiyum kanal blokörü olan “M3” (benzil 4- (2-hidroksi - 5-nitrofenil) - 2,6,6-trimetil - 5-okso - 1,4,5,6,7,8-hekzahidrokinolin - 3-karboksilat) ile sonuçlanmış olup tez kapsamında bu ilaç adayı molekül ile çalışılmıştır (18).

1,4-DHP türevlerinde, biyolojik aktivitenin düşmesine neden olacak olumsuz karakteristik özellik olarak; molekülde değişme (DHP’ler gün ışığında (400-600 nm) hızla “*nitrozopiridin*” türevlerine dönüşmektedir), sudaki zayıf çözünürlükleri ve farmakolojik etkide azalmaya hatta toksik etkiye yol açacak yüksek fotosensitivite sorunları bildirilmiştir (21). Bu sorunların üstesinden gelmek için bazı araştırmacılar, molekül üzerinde fotodegradasyondan sorumlu yapıların modifikasyonunu önerirken; bazı araştırmacılar ise, fiziksel ve kimyasal dayanıklılığını arttırmak için uygun bir formülasyon yaklaşımını önermektedir (22).

Nanokristal teknolojisi (NKT), znrlk sorunu olan etkin maddelerin partikül boyutunun küçültülmesi ile biyoyararlanım profilini iyileştirmek amacıyla uygulanan evrensel bir yaklaşım olmakla birlikte, literatürde 1,4-DHP türevlerine uygulanabilirliği ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır. NKT yaklaşımı ile, diğer nanofarmastiklere göre daha az miktarda etkin madde kullanılarak daha yüksek yükleme etkinliğine sahip ve daha stabil yapıların elde edilmesi ve 1,4-DHP türevi gibi etkin maddelerin çözünürlük sorunun aşılarak dozaj şekli haline getirilmesi mümkün olabilecektir.

1,4-DHP türevi yeni sentezlenmiş bir ilaç adayı olan M3’n NKT’ne dayalı ağızda dağılan film (ADF) formülasyonlarının geliştirilmesi, karakterize edilmesi ve değerlendirilmesini kapsayan bu tezin temel amaçları;

- Suda znrlğ çok düşük olduğu bilinen M3’n Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemin’deki (BCS) yerini tespit etmek,
- Zayıf znrlk ve düşük çözünme hızına bağlı olarak oral biyoyararlanım sorunu yaşayacağı ngrlen M3’n bu sorununu gidermek için NKT ile çözünürlüğünü iyileştirmek,
- Optimum nanokristal formülasyonu kullanarak çözücü dökme yöntemi ile ADF formülasyonlarını geliştirmek,

- İnsan kolorektal adenokarsinoma hücre hattı (Caco-2) kullanılarak yapılan hücre kültürü çalışmaları (sistotoksosite ve permeabilite çalışmaları) ile geliştirilen formülasyonların in-vitro etkinlik profilini değerlendirmek olarak sıralanabilir.

Tez kapsamında, hem L-tipi hem de T-tipi kanalları bloke etme yeteneğine sahip olan M3 yeni sentezlenmiş bir molekül olup, M3 içeren nanokristal formülasyonları ilk kez çalışılmıştır. Tez çalışması kapsamında geliştirilen M3 nanokristallerini içeren ADF formülasyonlarının geliştirilmesi ve karakterizasyonu piyasada henüz antihipertansif ilaç içeren ADF formülasyonunun olmamasından dolayı oldukça önem taşımaktadır. Nanokristallerin hazırlanması aşamasında öncelikle farklı stabilizan ve kriyoprotektan türleri/oranları ve farklı yöntem parametreleri ile M3 için uygun olan formülasyon kompozisyonu tasarlanmış, ardından optimum nanokristal formülasyonları ile pullulan bazlı ADF formülasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonlar üzerinde çeşitli fizikokimyasal analizler, stabilite çalışmaları ve hücre kültürü çalışmaları ile in-vitro etkinlik çalışmaları yapılmıştır. Yeni sentezlenen bu etkin maddenin içerdiği yapı sayesinde HT'nun daha başarılı bir klinik kontrolü için yenilikçi bir yaklaşım olarak kabul edilmesi, nanokristallerinin hazırlanması ile çözünürlük probleminin aşılması ve ADF formülasyonlarının hazırlanması ile tablet kullanımında zorluk yaşayan özellikle geriatric ve psikotik hasta popülasyonları gibi geniş bir hasta popülasyonunu da içine alarak hasta uyuncunun artırılması, suya erişimi kısıtlı olan hasta gruplarına hitap etmesi açısından özgün bir değer taşıdığı ve literatüre birçok yönden katkı sağlayabilecek nitelikte olduğu düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hipertansiyon Tanı ve Tedavisi

HT, genel olarak tekrarlayan ölçümlerde sistolik kan basıncının 140 mm Hg ve/veya diyastolik kan basıncının 90 mm Hg ya da üzerinde olması ile karakterize kardiyovasküler bir hastalıktır. HT'na bağlı yaşanan komplikasyonlarının her yıl 9,4 milyon ölüme neden olduğu bildirilmiştir (3). Bu sebeple HT, 2010 yılında yapılan bir araştırmaya göre, ekonomik olarak hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerdeki bireyleri etkileyen ve küresel hastalık yükü için önde gelen bir risk faktörü olarak gösterilmiştir (23). Bu kardiyovasküler riskin ileriye yönelik değerlendirilmesi için de Sistemik Koroner Risk Değerlendirmesi (SCORE) Modeli gibi çeşitli bilgisayar temelli yöntemler geliştirilmiştir. Avrupa'da yapılan kohort çalışmalar ışığında oluşturulan SCORE Modeli; yaş, cinsiyet, sigara alışkanlığı, toplam kolesterol ve sistolik kan basıncına göre 10 yıllık sürede kardiyovasküler hastalıktan ölüm riskinin hesaplanmasında kullanılmaktadır (24).

HT'un görülme sıklığı yaş, cinsiyet, ırk ve etnik kökene göre değişmektedir (25). Türkiye'de erişkinlerde yapılan epidemiyolojik çalışmalarla hastalığın görülme sıklığının yüksek olduğu, tanı ve tedavi oranlarının yeterli olmadığı bildirilmiştir. Bu durum, yaşlı nüfusun ve obezitenin artışı, diyetle fazla tuz alımının yanı sıra antihipertansif ilaçların biyolojik ortamda karşılaştığı kısıtlayıcı faktörler ve bireysel farklılıklar ile de ilişkilendirilmiştir (3).

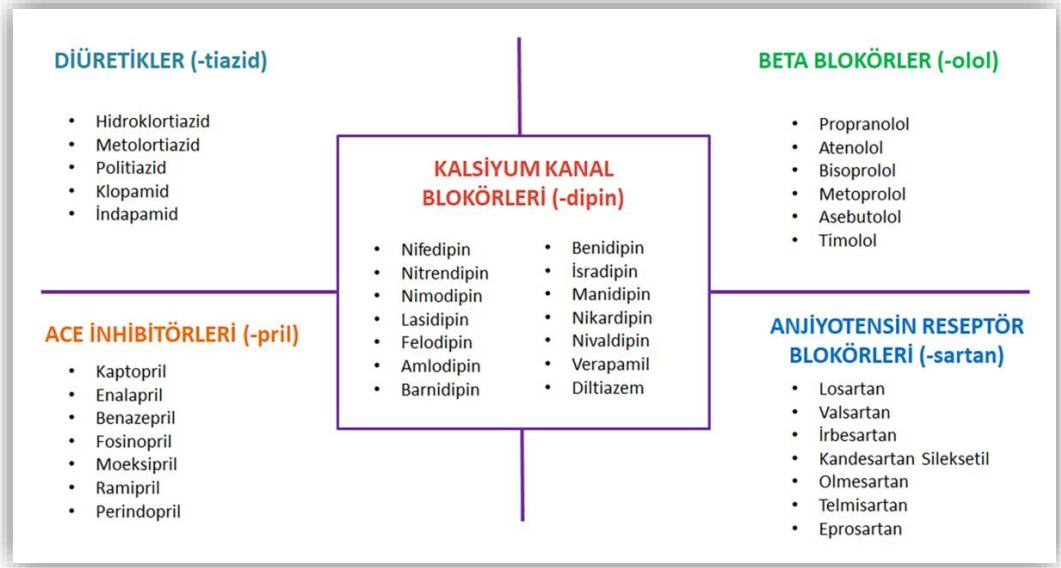
HT, temelde primer (esansiyel) ve sekonder HT olarak tanımlanmakla birlikte gün içerisindeki sirkadiyen ritme göre değişen kan basıncına bağlı olarak farklı şekillerde de sınıflandırılabilir. Tüm HT olgularının yaklaşık %80-90'ını mekanizması tam olarak bilinmeyen ve herhangi bir ikincil hastalığa bağlı olmayan primer HT oluştururken, %10-20'sini ise endokrin, renal ve nörolojik nedenler gibi çeşitli hastalıkların neden olduğu sekonder HT oluşturmaktadır (3, 4).

HT tanısı için öncelikle kişi en az 5 dak. dinlendikten sonra, avucu açık ve kol kalp seviyesinde olacak şekilde tekrarlayan ölçümler yapılarak kan basıncı kaydedilmektedir (3). Burada sistolik kan basıncı ölçümü özellikle önemlidir. Çünkü yaşa bağlı olarak artan kan basıncı sebebiyle, 80 yaş ve üzeri hasta gruplarında

sistolik kan basıncının 150 mm Hg üzerinde olmasının kabul edilebilir bir durum olduğu yapılan çalışmalarla bildirilmiştir (3, 24). Ayrıca aritmi olan hastalarda kan basıncı ölçümü için kullanılan otomatik cihazlar hatalı sonuç verebileceğinden nabız değerlendirilmesi hastalık tanısında kritik bir önem arz etmektedir. Bu sebeple aritmisi olan hasta gruplarında risk faktörlerini belirlemek ve hastalık tanısı için her klinik muayenede 30 sn'den kısa olmamak koşulu ile nabız ölçümü, hastalık öyküsünün irdelenmesi, fiziksel muayene ve gerekli laboratuvar verilerinin incelenmesi gerekir (3). Tüm bu incelemelerden sonra hasta için çeşitli yasal otoritelerin tanımlamış olduğu sınıflamaya göre tanı konulabilir.

HT'un tedavisinde ilk aşamada; tuz ve alkol kısıtlaması, sağlıklı beslenme, hareketli bir yaşam, stres yönetimi, ideal vücut ağırlığına dikkat etme gibi yaşam tarzı değişiklikleri önerilmektedir. Yaşam tarzı değişiklikleri ile kontrol altına alınamayan ya da bu tedavi yönteminin başarılı olmadığı olgularda ilaçla tedaviye başvurulmaktadır. Kişinin yaşı, kan basıncı değerleri ve eşlik eden sekonder hastalıkları dikkate alınarak antihipertansif ilaçların biri ya da birkaçının kombinasyonu ile uygun ilaç tedavisine karar verilmektedir (1-3).

Antihipertansif ilaçlar, genel olarak primer etki bölgeleri, etki mekanizmaları ve tarihsel gelişim sıralarına göre; diüretikler, beta blokörler, KKB'leri, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri ve anjiyotensin reseptör blokörleri olarak sınıflandırılmaktadır (3, 9, 24). Klinikte sıklıkla kullanılan bazı antihipertansif ilaçlar Şekil 2.1.'de özetlenmiştir.



Şekil 2.1. Klinikte sıklıkla kullanılan antihipertansif ilaç grupları ve örnekleri.

2.2. Antihipertansif İlaçların Oral Biyoyararlanımını Kısıtlayan Faktörler ve Biyoyararlanımlarının Artırılmasına Yönelik Genel Stratejiler

Terapötik açıdan etkisi onaylanmış bir ilaç etkin maddesinin vücutta hedef bölgeye etkili ve güvenilir bir şekilde ulaşabilmesinde oral, parenteral, pulmoner, oküler ve topikal uygulama gibi birçok uygulama yolu mevcuttur (26). Günümüzde hala bu uygulama yolları arasında en yaygın ve en popüler olanı oral uygulamadır (27). Çünkü oral yol; özellikle özel hasta popülasyonları için bireysel uygulama, ağrıdan kaçınma, uygulama kolaylığı, yüksek hasta uyuncu, tasarım esnekliği, düşük maliyet ve kontrollü ölçeklendirme gibi avantajlar sunmaktadır (28, 29). Antihipertansif ilaç tedavisinde de sağladığı bu avantajlar sebebiyle genellikle oral uygulama yolu tercih edilmektedir. Fakat oral yoldan uygulanan birçok konvansiyonel dozaj formunda, antihipertansif ilaç etkin maddelerinin sahip olduğu bir takım fizikokimyasal özellikler ve biyolojik faktörler nedeniyle biyoyararlanım sorunları yaşanmaktadır (30, 31). Antihipertansif ilaçlarda oral biyoyararlanımı kısıtlayan faktörler aşağıdaki gibi sıralanabilir.

a) İlacın absorpsiyon bölgesinde çözelti formunda olması gerekliliğine karşı birçok antihipertansif etkili ilacın suda zayıf çözünür özelliğe sahip olması,

b) İlacın lipit yapılı membrandan geçiş oranını belirleyen faktör olan partisyon katsayısının (Log P) uygun olmaması,

c) İlacın karaciğerde presistemik eliminasyona uğraması,

d) P-glikoprotein (P-gp) aracılı iletim sisteminin ilacın absorpsiyonunu sınırlandırması,

e) İlacın gastrointestinal sistem fizyolojisinden etkilenmesi ve çeşitli enzimatik yollarla parçalanması (28, 32),

f) Bazı antihipertansif ilaçların yarılanma ömrünün kısa olması ve ışığa maruziyette bozunmasıdır (31),

Oral biyoyararlanım sorunu yaşayan bazı antihipertansif ilaçlar ve nedenlerine ilişkin genel bilgiler Tablo 2.1.'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Oral biyoyararlanım problemi yaşayan bazı antihipertansif ilaçlar ve nedenleri.

Sınıf	Etkin Madde	Yarı Ömür ($t_{1/2}$, saat)	Çözünürlük ($\mu\text{g/mL}$)	Log P	Presistemik Eliminasyon	P-gp Substrat	BCS Sınıf	Oral Biyoyararlanım (%)	Kaynak
Diüretikler (-tiazid)	Hidroklortiazid	5,6-14,8	7×10^2				4	65	33, 34
Beta blokörler (-lol)	Celiprolol	4-5				+		30-70	35-37
	Atenolol	6-9	1×10^3	0,5			3	46-62	38-41
	Labetolol	3,5	33,3	7,08	+		1	60-75	42-44
	Talinolol	12	20	3,5		+	2	55	43, 45- 48
	Karvedilol	6-10	pH bağımlı çözünürlük pH>9, çözünürlük<1 pH=7, çözünürlük=23 pH=5, çözünürlük=100	3,8	+	+	2	25-30	42, 49-51
Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri (-pril)	Kaptopril	2-3					3	75 (Yiyecek etkisi sonucu; 30-50)	42, 43, 52
	Lizinopril	12,6	10^2	-2,86			3	25	43, 53
Anjiyotensin Reseptör Blokörleri (-sartan)	Valsartan	5-6	<100	5,8	+	+	2	<25	54-56
	Telmisartan	24	9,9	7,7	+	+	2	42	57-60

Tablo 2.1. Oral biyoyararlanım problemi yaşayan bazı antihipertansif ilaçlar ve nedenleri (Devam).

Sınıf	Etkin Madde	Yarı Ömür (t _{1/2} , saat)	Çözünürlük (µg/mL)	Log P	Presistemik Eliminasyon	P-gp Substrat	BCS Sınıf	Oral Biyoyararlanım (%)	Kaynak
Anjiyotensin Reseptör Blokörleri (-sartan)	Olmesartan medoksomil	10-15	<8	4,31	+	+	2	28	61, 62
	Kandesartan sileksetil	9-13	<0,15	>1		+	2	15	46, 63-65
Kalsiyum kanal blokörleri (-dipin)	Nifedipin	0,2-1	20	2,5	+	+	2	45-68	35, 42, 66-70
	Nitrendipin	12-24	2,0 (37 °C)	3,59	+	+	2	10-20	42, 71-74
	Nikardipin	6-8	7,9x10 ³ (37 °C)	18,6x10 ³	+	+	2	35	35, 67, 75-78
	Nisoldipin	7-12	5,7	3,1	+		2	5.5	30, 67, 79, 80
	Nimodipin	1-2	2,3	3,41	+	+	2	4-13	67, 81-83
	Isradipin	8-12	<10	4,28	+	+	2	15-24	67, 84, 85
	Felodipin	11-16	7,15	4,36	+	+	2	10-20	30, 67, 86-88
	Amlodipin	44	74,3	2,22	+	+	1	64	30, 42, 43, 67, 89
	Verapamil	6-8	7x10 ³	3,8	+	+	1	10-20	30, 35, 39, 67, 90
Diltiazem	6-8	>590x10 ³ (37 °C)	1,54	+	+	1	~40	35, 42, 43, 67, 89, 91-93	

2.2.1. Çözünürlük

Bir ilacın çözünürlüğü (doygunluk ya da denge çözünürlüğü; literatürde “*saturation solubility*”, “*equilibrium solubility*” ve genel bir ifade olarak “*aqueous solubility*” ifadeleri kullanılmaktadır), vücut sıcaklığında ve biyolojik sıvılarda ilacın maksimum çözünen madde miktarını ifade etmektedir (94-96). Başka bir deyişle doygunluk çözünürlüğü, çözünen ve çözünmeyen bileşenin dengede olduğu değerdir. Günümüzde ilaç endüstrisindeki ilaç etkin maddelerinin %40’ı düşük çözünürlüğe sahip iken, son yıllarda geliştirilen ilaç etkin maddelerinin %90’ının sudaki çözünürlük değerlerinin düşük olduğu bildirilmiştir (97-99). Sadece çözünmüş ilacın iyonik olmayan kısmının kan dolaşımına geçebilmesi nedeniyle oral yoldan uygulanan ilacın sistemik etki gösterebilmesi için gastrointestinal ortam sıvılarında çözünmesi gerekmektedir. Dolayısıyla bir ilacın oral biyoyararlanımı etkin maddenin vücut sıvılarındaki çözünürlüğüne bağlıdır ve çözünürlük problemi, dozaj şekliyle düzensiz salım ve düzensiz absorpsiyon (*erratic absorption*) gibi problemler sebebiyle ilacın oral biyoyararlanımını kısıtlamaktadır (32, 98, 100). Özellikle DHP grubu KKB’leri olmak üzere birçok antihipertansif ilacın suda zayıf çözünür özelliğe sahip olması, oral yoldan uygulamayı yavaş ve yetersiz absorpsiyon sebebi ile sınırlandırmakta ve bunun yanı sıra bu etkin maddelerle formülasyon geliştirme çalışmaları açısından da sorun yaratmaktadır (28, 30, 32, 101, 102). Ayrıca, suda çözünürlüğü düşük ilaçların kanda terapötik seviyeye ulaşması için yüksek dozda uygulanmaları, ilacın gastrointestinal mukozal toksisitesini de artırmaktadır (103). Tüm bu nedenlerle, formülasyon tasarımı ve geliştirme süreci boyunca ilacın çözünürlük özelliklerinin iyileştirilmesine yönelik çalışmalar fayda sağlayıcıdır (32). Bu amaçla, çeşitli fiziksel ve kimyasal temelli yöntemler geliştirilmiştir. Bunlardan bazıları partikül boyutunun azaltılması (mikronizasyon, nanonizasyon), kristal yapı modifikasyonu (polimorflar, psödopolimorflar), kompleks oluşturma (siklodekstrinler ya da sürfaktan maddeler kullanılarak hazırlanan kompleksler, dendrimerler ile konjugasyon), ko-solvent ilavesi ve çeşitli taşıyıcılar ile ilaç dispersiyonlarının hazırlanması (ötektik karışımlar, katı çözeltiler, katı dispersiyonlar) gibi fiziksel yöntemler ve ilacın çözünebilen ön ilaç veya tuz formunun kullanılması gibi kimyasal yöntemlerdir (32, 98, 99, 104-106). Çözünürlük

artırma yönteminin seçimi, ilacın fizikokimyasal özelliklerine, emilim bölgesine ve gerekli dozaj formuna bağlı olarak yapılmaktadır (105).

İlk kez 1995 yılında, Amidon ve ark. (107) tarafından geliştirilen BCS, günümüzde özellikle oral yoldan uygulanan formülasyonların geliştirmesi ve biyomuafiyet (biyoeşdeğerlikten vazgeçme) çalışmalarının temelini oluşturmaktadır (32). BCS'ne göre hemen salım sağlayan sistemlerde (Immediate-release (IR); bazı kaynaklarda “*hızlı salımlı sistemler*” olarak da adlandırılmaktadır) kullanılan ilaçların absorpsiyon hızı ve oranı, ilacın vücut sıvılarındaki çözünürlüğüne ve bağırsak permeabilitesine bağlıdır. Bu özelliklere göre ilaçlar dört ana sınıfta değerlendirilmiştir. Yüksek çözünürlük/yüksek permeabilite gösteren ilaçlar, *Sınıf 1*; düşük çözünürlük/yüksek permeabilite gösteren ilaçlar, *Sınıf 2*; yüksek çözünürlük/düşük permeabilite gösteren ilaçlar, *Sınıf 3* ve düşük çözünürlük/düşük permeabilite gösteren ilaçlar ise, *Sınıf 4*'de yer almaktadır (107). Amerika İlaç ve Gıda Dairesi (FDA) başta olmak üzere, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) gibi yasal otoritelerce belirlenen kriterler doğrultusunda; ilacın hemen salım sağlayan katı dozaj formunun piyasadaki en yüksek dozu, pH 1,2-6,8 aralığında ve 250 mL veya daha az miktardaki ortamda çözünüyorsa ilacın yüksek çözünürlüğe ve %85'den fazla emilim profili gösteriyorsa yüksek intestinal permeabiliteye sahip olduğu kabul edilmektedir (108-113). *Sınıf 2*'de yer alan ilaçlar yüksek permeabiliteye sahip olmasına rağmen oral biyoyararlanımları, düşük çözünürlük sebebi ile kısıtlıdır (32, 98). Bu ilaçlar, gastrointestinal sıvılarda hem tamamen çözünmediği hem de olası çözünme daha uzun sürede gerçekleştiği için, absorpsiyonda hız sınırlayıcı basamak çözünme hızıdır ve çözünme hızlarının artırılması ile oral biyoyararlanımın artırılabilceği bildirilmiştir (32, 98, 101, 103). Çözünme hızı, oral katı dozaj şekliinden birim zamanda çözünerek çözünme ortamına geçen madde miktarını ifade etmektedir ve ilk kez 1897 yılında Noyes ve Whitney (114) tarafından tanımlanmıştır (Eşitlik 2.1.). Sonrasında 1904 yılında Nernst-Brunner ve ark. (115) tarafından çözünme hız sabiti ve çözünme kinetiğinde etkili olan parametreler araştırılmış ve bir eşitlik ile ifade edilmiştir (Eşitlik 2.2.). Nernst-Brunner eşitliğine göre; çözünme hızı çözünme ortamı ile temas halinde bulunan etkin maddenin yüzey alanı ile doğru orantılıdır. Partikül büyüklüğündeki azalma ile artan spesifik yüzey alanına bağlı olarak çözünme hızı artırılabilir. Bu

sebeple, genel olarak çözünürlüğü az olan maddelerin çözünme hızlarının artırılmasında partikül boyutunun azaltılması etkili bir strateji olarak karşımıza çıkmaktadır (101, 103).

$$dC/dt=k(C_s-C) \quad (2.1.)$$

$$dC/dt=DS/Vh(C_s-C) \quad (2.2.)$$

dC/dt : t zamanında etkin maddenin çözünme hızı, k: Çözünme hızı sabiti, C_s : İlacın doyumluk konsantrasyonu, C: t zamanında V çözünme hacmindeki çözülmüş madde miktarı, S: İlacın spesifik yüzey alanı, D: Difüzyon katsayısı, h: Difüzyon tabakasının kalınlığı, V: Çözünme hacmi

Sınıf 3'de yer alan ilaçlar için yüksek çözünürlük sayesinde hızlı bir çözünme elde edilebilirken oral biyoyararlanım permeabilite oranı ile sınırlıdır. Çeşitli emilim arttırıcılar (absorption enhancer) ile permeabilitenin iyileştirilmesi *Sınıf 3*'de yer alan ilaçlar için uygun bir formülasyon seçeneği olabilmektedir. *Sınıf 4*'de yer alan ilaçlar, her ne kadar hem çözünürlük hem de permeabilitenin sınırlı olması sebebiyle formülasyon geliştirme çalışmaları için zayıf adaylar olsalar da *Sınıf 2*'de yer alan ilaçlar için kullanılan mevcut yaklaşımlar, emilim arttırıcılar ile birlikte *Sınıf 4*'de yer alan ilaçları formüle etmek için uygulanabilmektedir (32). Xia ve ark. (71) yapmış oldukları bir çalışmada, *Sınıf 2*'de yer alan bir KKB olan ve oral biyoyararlanımı düşük çözünürlük sebebiyle yaklaşık %10-20 arasında değişen nitrendipinin çözünme hızını ve biyoyararlanımını iyileştirebilmek için, presipitasyon-ultrasonikasyon yöntemi kullanarak nanosüspansiyon formülasyonunu geliştirmişlerdir. Ortalama 36,6 µm partikül boyutuna sahip ilacın ortalama partikül boyutu 209 ± 9 nm'ye düşürülmüş ve bu sayede çözünme hızında ve doyumluk çözünürlüğünde anlamlı bir artış gözlenmiştir. Ayrıca Wistar cinsi erkek sıçanlarda yapılan in vivo biyoyararlanım çalışmaları, oral biyoyararlanımın ilacın ticari tabletlerine göre 5 kat arttığını göstermiştir (12 saat boyunca izlenen plazma profiline göre, farmakokinetik parametrelerden C_{maks} 'ın 6,1 ve $AUC_{0 \rightarrow 12}$ 'nin ise 5 kat ilacın ticari tabletlerine kıyasla daha yüksek olduğu gösterilmiştir) (71).

Çözünürlük probleminin yanı sıra gastrointestinal toksisite, stabilite ve zayıf absorpsiyona bağlı düşük biyoyararlanım sorunlarına karşı bazı antihipertansif ilaçların oral uygulamasında ilacın aktif olmayan türevi olan ön ilaç (prodrug)

yaklaşımı uygulanmaktadır (116). Fosinopril, enalapril, imidopril, kinapril, moeksipril, perindopril, ramipril ve zofenopril gibi anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri sınıfında yer alan birçok antihipertansif ilacın ön ilaç formu biyoyararlanım probleminin üstesinden gelmek için kullanılmaktadır (116-118). Ön ilaç, bağırsaktan absorbe edilen türevin karaciğerden geçerken kimyasal veya enzimatik biyotransformasyona uğraması sonucu aktif şekline dönüşmesi ile terapötik etkinliğini göstermektedir.

2.2.2. Partisyon Katsayısı

Bir ilacın Log P değeri, maddenin lipofilik ve hidrofilik karakterini göstermekle birlikte, ilacın absorpsiyon hızı ve oranı ile yakından ilişkilidir. Oral uygulama sonrası Log P değerinin absorpsiyon üzerindeki rolü incelendiğinde; genel olarak Log P değerleri 1-3 arasında olan bileşikler iyi emilim gösterirken Log P değeri 6'dan büyük veya 3'den küçük olması durumunda ilacın zayıf emilim gösterdiği bildirilmiştir. Log P değeri arttıkça yapı daha lipofilik iken azaldıkça daha hidrofilik özellik göstermektedir. Yüksek Log P değerine sahip bileşiklerde gözlenen düşük emilim, bu bileşiklerin suda zayıf çözünürlüğüne ve membranın lipofilik bölgelerini tercih etmelerine bağlanmaktadır. Çok polar olan maddeler ise membran bariyerine nüfuz edemedikleri için zayıf biyoyararlanım göstermektedir (53, 119, 120). Ayrıca Lipinski ve ark.'na (119) göre; formülasyon yaklaşımı açısından en iyi ilaçlar Log P değeri 5 den küçük olan maddelerdir. Niaz ve ark. (31) yapmış oldukları bir çalışmada, oldukça hidrofobik yapıda olan amlodipin, kaptopril ve valsartanın asidik mide ortamında parçalanmasını engellemek, intestinal hücreler tarafından alımını artırmak, gastrointestinal kanalın daha aşağı kısımlarında kontrollü ve etkin ilaç salımını sağlamak amacıyla, toksik olmayan iki doğal polimer (sodyum aljinat ve kitosan) kullanarak hibrit nanopartiküllerini hazırlamıştır. Enkapsülasyon etkinliğinin en yüksek tespit edildiği (%96 ± 1,9) kaptoprilin in-vitro salım çalışmaları sonucu 24 saat boyunca sürekli salım yaptığı gösterilmiş ve poliyonik hibrit nanopartiküllerin antihipertansif ilaçların oral yoldan verilmesinde umut vaat edici sistemler olduğu bildirilmiştir (31).

2.2.3. Presistemik Eliminasyon

Oral yoldan alınan bir ilacın gastrointestinal sistem mukozasından absorpsiyonu sonrasında portal dolaşım ile karaciğer hücrelerine geçmesi ve bu hücrelerde enzimatik yıkım sonucu aktif olmayan metabolitlere dönüştürülmesi “ilk geçiş eliminasyonu (literatürde “*first pass elimination*” ve “*first pass effect*” gibi ifadeler kullanılmaktadır)” ya da “presistemik eliminasyon (presystemic elimination)” olarak adlandırılmaktadır. Sistemik etki hedeflenen antihipertansif etkili ilaç molekülünün presistemik eliminasyon sebebi ile tümünün sistemik dolaşıma geçememesi, terapötik etkinliğin sağlanabilmesi için uygulanan dozun artırılması gerekliliği ile sonuçlanmaktadır ve dozun artırılmasına bağlı olarak ilacın yan etki profilinde artış gözlenebilmektedir. Terapötik aralığı dar olan ilaçlar için dozun yükseltilmesi bireyler arası farklılıklar sebebiyle sakıncalı olduğu için farklı alternatif yaklaşımlar önerilmektedir. Bir KKB olan nifedipinin, gastrointestinal kanaldan kolayca ve neredeyse tamamen emilmesine rağmen, presistemik eliminasyona uğraması ve çözünürlük probleminin olması oral biyoyararlanımını yüksek oranda sınırlandırmaktadır (66, 121-123). Literatürde ilacın çözünürlük ve biyoyararlanımının artırılması amacıyla, etkin maddenin mikronizasyonu, katı dispersiyonunun veya nanokristal formunun hazırlanması gibi yöntemler önerilmektedir (66, 121). Ayrıca polimer bazlı nanotaşıyıcı sistemlerin ince bağırsağın lenfoid dokusundaki M hücreleri aracılığıyla lenfatik sisteme doğrudan geçişi ile presistemik eliminasyonunun engelleyebileceği bildirilmiştir (30, 124, 125). Labetolol, karvedilol, verapamil, diltiazem, nifedipin, nitrendipin, nikardipin, nimodipin, nisoldipin, isradipin, felodipin, amlodipin, valsartan, telmisartan ve olmesartan presistemik eliminasyon sebebi ile oral biyoyararlanımı olumsuz etkilenen diğer antihipertansif ilaçlardır (42, 44, 55, 58, 62, 64, 70, 75, 79, 81, 84, 86, 90, 91).

2.2.4. P-glikoprotein Aracılı İletim Sistemi

İlk defa 1976 yılında Juliano ve Ling (126) tarafından tanımlanan P-gp, gastrointestinal kanalda enterositlerin apikal membranında yer alan bir membran proteini olup ATP hidrolizine bağımlı olarak çalışmaktadır (35, 127). Bazı ilaçlara karşı membran geçirgenliği üzerindeki rolü nedeniyle, “permeability” kelimesinin

baş harfi olan “P” harfi ile isimlendirilmiştir (126). Son yıllarda yapılan çalışmalar P-gp aracılı iletim sisteminin, bazı ilaçların enterositlere alınmasını sınırlandırdığını ve intestinal sekresyon ile kandan bağırsak lümenine atılmasını kolaylaştırdığı için absorpsiyon ve oral biyoyararlanımı olumsuz etkilediğini ve sonuç olarak ilaçların farmakokinetiği ve farmakodinamiğini değiştirdiğini göstermiştir (28, 35, 46, 127). Bu sorunun üstesinden gelebilmek için çeşitli P-gp inhibitörleri geliştirilmiştir. Fakat, şimdiye kadar hiçbir P-gp inhibitörü içeren oral taşıyıcı sistem, çeşitli sistemik yan etkiler oluşturması nedeniyle resmi otoriteler tarafından onaylanmamıştır. Sonrasında ilaç formülasyonlarında kullanılan ve genellikle farmasötik etkinliği bulunmayan (inert) yardımcı maddeler (eksipyanlar), özel bir P-gp inhibitörleri sınıfı olarak ortaya çıkmıştır (46). Gurunath ve ark. (46) yapmış oldukları bir çalışmada, P-gp iletim sisteminin yanı sıra düşük çözünürlük sebebi ile biyoyararlanım sorunu yaşayan kandesartan sileksetilin katı dispersiyonlarını hazırlamıştır. Doğal bir P-gp inhibitörü olan naringin’in kullanıldığı formülasyonlarda, ilacın süspansiyonuna kıyasla daha yüksek çözünürlük elde edilmesinin yanı sıra albino erkek tavşanlarda yapılan in vivo biyoyararlanım çalışmaları sonucunda intestinal permeabilite artışına bağlı olarak ilacın biyoyararlanımında 3,7 kat iyileşme gözlenmiştir (46). Bir diğer antihipertansif ilaç olan talinolol için, Deferme ve ark. (45) yapmış olduğu bir çalışmada, kayısı ekstraktının ilacın oral biyoyararlanımı üzerinde olumlu etki göstermesinin yanı sıra P-gp’ye bağlı ilaç-besin etkileşimine de dikkat çekmiştir. Ayrıca celiprolol ve asebutolol gibi bazı ilaçlar için uygulanan doz arttıkça biyoyararlanımın arttığı gözlenmiş ve bu durum intestinal lümendeki transport sisteminin doyunluğa ulaşmasına bağlanmıştır (36). Celiprolol, bunitrolol, karvedilol gibi beta blokörler, nifedipin, nitrendipin, nikardipin, nimodipin, isradipin, felodipin, amlodipin, diltiazem, verapamil gibi birçok KKB ve telmisartan, olmesartan gibi anjiyotensin reseptör blokörleri P-gp substratı olan diğer antihipertansif ilaçlardır (30, 35, 36, 46, 49, 54, 55, 60, 62, 73, 75, 82, 84, 89, 90).

2.2.5. İlacın Gastrointestinal Sistem Fizyolojisinden Etkilenmesi

Gastrointestinal sistem pH’ı 1 ile 8 arasında değişmekle birlikte pH aralığındaki bu geniş fark özellikle protein yapılı ilaçların oksidasyonu, deamidasyonu veya hidrolizi sonucu ilacın farmakolojik aktivitesini ciddi şekilde

engelleyebilmektedir. Anjiyotensin reseptör blokörü olan kandesartan sileksetil'in asidik pH'da kimyasal bozunmaya uğraması sonucu oral biyoyararlanımının olumsuz etkilendiği ve buna karşı ilacın gastrointestinal sistem sıvılarıyla doğrudan etkileşmesini engelleyecek bir nanotaşıyıcı sistem içerisine enkapsüle edilmesinin biyoyararlanıma katkı sağlayacağı bildirilmiştir (30).

Antihipertansif ilaçların oral yoldan uygulanmasında kullanılan bir diğer yaklaşım, antihipertansif ilaçların kısa yarı ömür ve kısa gastrik kalış süresine bağlı düşük biyoyararlanım problemlerine karşı önerilen “*Gastroretentif İlaç Taşıyıcı Sistemler'in (Gastroretentive Drug Delivery Systems (GRDDS))*“ hazırlanması yaklaşımıdır (27). Bu taşıyıcı sistemler sayesinde ilacın gastrik boşalma süresi uzatılarak gastrointestinal sistem membranları ile etkileşimin ve biyoyararlanımın artırılmasının yanında çözünürlüğün de artırılacağı bildirilmiştir (27, 128, 129). Günümüzde bu taşıyıcı sistemler kullanılarak geliştirilmiş ve ticarileşen birçok ürün bulunmaktadır. *Prazopress XL*[®] (Prazosin hidroklorür, Efervesan ve şişme bazlı yüzer sistem, Sun Pharma, India), *Coreg CR*[®] (Karvediol, Ozmotik sistem, Glaxosmithkline, USA), *Covera HS*[®] (Verapamil Hidroklorür, OROS teknolojisi, DURECT Corporation, USA) ve *Sular*[®] (Nisoldipin, *Geomatrix*[®] teknolojisi, Skyepharma, Shionogi Pharma Inc., UK) antihipertansif ilaçlar için ilaç piyasasında bulunan gastroretentif ilaç taşıyıcı sistemlerdir (129).

Antihipertansif ilaçların klinikte kullanılmalarında yaşanan başka bir problem, yarı ömürlerinin kısa olması sebebiyle sık dozlama gereklilikleridir (27, 30). Uzatılmış salım sistemlerinin hazırlanması, sık dozlama gerekliliğine bir çözüm sunarken, oral biyoyararlanımın artırılması hususunda daha çok çeşitli nanotaşıyıcı sistemlerin kullanılması önerilmektedir (7, 28, 30).

2.3. Antihipertansif İlaçların Oral Biyoyararlanımının Artırılması İçin Kullanılan Nanotaşıyıcı Sistemler

Son yıllarda yapılan çalışmalar ve elde edilen olumlu sonuçlar oral biyoyararlanımın artırılması amacıyla nanotaşıyıcı sistemlerin kullanılması yaklaşımına dikkat çekmiştir. Gastrointestinal sistem kısımlarından ince bağırsakta villus ve mikrovillus yapılarının varlığı, geniş bir absorpsiyon alanı sunarken

tasarlanan nanotaşıyıcı sistemin özellikle bu bölgede salım yapmasının oral biyoyararlanımı istenilen düzeyde artıracığı düşünülmektedir. Fakat nanotaşıyıcı sistemin oral uygulamasının ardından organizmada karşılaştığı ve aşması gereken birçok bariyer bulunmaktadır. Bu bariyerlerden en önemlisi bağırsak epitelini örten mukoza tabakasıdır (30, 125, 130, 131). Bu tabakayı oluşturan goblet hücrelerinin sürekli mukus üretimi, ilaçların penetrasyonunu ve absorpsiyonunu engellemektedir. Mukozal yapının gözenek açıklığı 50-1800 nm aralığındadır ve küçük partikül büyüklüğüne sahip nanotaşıyıcı sistemler, mukustaki bu boşluklardan geçebilmekte ve partikül büyüklüğüne bağlı olarak bariyerin aşılmasını sağlayabilmektedir (125, 130, 131). Mukozal bariyerin aşılmasının ardından bağırsak epitel hücrelerinden nanotaşıyıcı sistemin geçişi, paraselüler, transselüler, taşıyıcı ve reseptör aracılı transport gibi çeşitli transport mekanizmaları ile gerçekleşmektedir (30, 131). İnce bağırsağın lenfoid dokusundaki Peyer plakları içerisinde ve bağırsak epitel hücreleri arasında konumlanmış olan M hücreleri, mukus salgılayamadığı ve P-gp ekspresyonunu gerçekleştirmediği için nanotaşıyıcıların hedeflendirilmesinde önemli bir role sahiptir. Nanotaşıyıcı sistemin bu yolla hücre içine alımı P-gp iletim sistemi nedeniyle absorpsiyonu düşük olan ilaçların absorpsiyonunu artırmasının yanı sıra presistemik eliminasyonun da aşılmasını sağladığı için biyoyararlanımın artmasına katkı sağlamaktadır (30, 124, 125). Taşıyıcı sistemin partikül boyutu, şekli, yüzey özellikleri, gastrointestinal kanalda ve hücre içine alım bölgesindeki kalış süresi, bağırsak epitel yüzeyine adezyon ve mukus bariyerini aşabilme yeteneği gibi özellikler ilacın oral biyoyararlanımını doğrudan etkilemektedir (124). Antihipertansif ilaçların oral biyoyararlanımının artırılması amacıyla kullanılan taşıyıcı sistemler genel olarak, polimer bazlı sistemler (polimerik nanopartiküller, katı lipit nanopartiküller, dendrimerler, polimerik miseller, karbon nanotüpler), mezoporlu silika nanopartiküller, nanoemülsiyonlar, kendiliğinden emülsifiye olan sistemler (SEDDS), nanosüspansiyonlar, nanokristaller, ve nanoveziküler sistemler (lipozomlar, niozomlar, etozomlar, invazomlar, transferozomlar) olarak bildirilmiş olup oral biyoyararlanım problemi olan antihipertansif ilaçlar için tasarlanmış bazı nanotaşıyıcı sistemler ve özelliklerine ait bilgiler Tablo 2.2.'de özetlenmiştir.

Tablo 2.2. Antihipertansif ilaçların oral biyoyararlanımının artırılması amacıyla kullanılan bazı nano taşıyıcı sistemler.

İlaç Sistem	Taşıyıcı	Etkin Madde	Kullanılan Yardımcı Maddeler	Hazırlama Yöntemi	Partikül Boyutu (nm)	İlaç Yükleme Kapasitesi (% ± Standart sapma (SS))	İn vitro/ex vivo/in vivo Model	Yorum	Kaynak
Katı nanopartikül	lipit	Karvedilol	Monogliserit, Soya lesitini, Poloksamer 188, Stearilamin, N-Karboksimetil kitosan (MCC)	Sıcak homojenizasyon ve ultrasonikasyon	61,8 ± 2,8 – 108,2 ± 4,3	95,8 ± 1,4 – 98,5 ± 1,3	Wistar cinsi erkek sıçan	Karvediol süspansiyonuna kıyasla MCC kaplı katı lipit nanopartiküller ile ilacın bağlı biyoyararlanımında yaklaşık 3,2 kat artış elde edilmiştir. Katı lipit nanopartiküllerin MCC ile kaplaması sonucu taşıyıcı sistem hem gastrik ortamdan korunmuştur hem de ilacın ani salımının engellenmesi ile kontrollü ve uzun bir ilaç salımı sağlanmıştır.	132
		Nitrendipin	Trigliserit (tripalmitin), Monogliserit (gliseril monostearat), Balmumu (setil palmitat), Poloksamer 188	Sıcak homojenizasyon ve ultrasonikasyon	121,6 ± 1,75 – 136,2 ± 1,34	91,8 ± 0,36 – 97,53 ± 0,11	Wistar cinsi erkek sıçan	Franz difüzyon hücresi kullanılarak (pH 6,8 fosfat tamponunda) 48 saat boyunca gerçekleştirilen in vitro salım çalışmaları sonucu katı lipit olarak gliseril monostearat kullanılan katı lipit nanopartikül formülasyonunda daha iyi bir salım profili (%37,8) elde edilmiştir. Intraduodenal uygulama sonrası nitrendipin biyoyararlanım süspansiyonuna kıyasla 3-4 kat kadar artmıştır.	133
		Nimodipin	Palmitik asit, Poloksamer 188, Soya lesitini	Yüksek basınçlı sıcak homojenizasyon	116,0 ± 21 – 525,5 ± 34	84,45 ± 9,2 – 93,96 ± 1,73	Albino Wistar cinsi sıçan	pH 6,8 fosfat tamponunda gerçekleştirilen in vitro salım çalışmaları sonucu, 2 ³ faktöriyel dizayn kullanılarak optimize edilen nimodipin katı lipid nanopartikül formülasyonunun (F8), 10 saat boyunca sürekli salım (%87,52 ± 2,54) sağladığı gösterilmiştir. Oral uygulama sonrası elde edilen farmakokinetik parametreler, ilacın biyoyararlanımının nimodipin çözeltisine kıyasla yaklaşık 2,08 kat arttığını göstermiştir.	83

Tablo 2.2. Antihipertansif ilaçların oral biyoyararlanımının artırılması amacıyla kullanılan bazı nano taşıyıcı sistemler (Devam-1).

İlaç Sistem	Taşıyıcı Madde	Etkin Madde	Kullanılan Yardımcı Maddeler	Hazırlama Yöntemi	Partikül Boyutu (nm)	İlaç Yükleme Kapasitesi (% ± SS)	İn vitro/ex vivo/in vivo Model	Yorum	Kaynak
Katı lipit nanopartikül		Nebivolol hidroklorür	Kitozan oligosakkarit laktat, Polietilen glikol (PEG) stearat, Kompritol 188, Poloksamer 188, Soya lesitini	Yüksek devirli homojenizasyon	213,4 ± 17,47 - 438,8 ± 39,4	83,89 ± 1,8 - 98,04 ± 0,2	Caco-2 hücre hattı Spague Dawley cinsi erkek sıçan	pH 1,2 ve pH 6,8 tampon ortamlarında gerçekleştirilen in vitro salım çalışmaları sonucu 8 saat boyunca kontrollü ilaç salımının sağlanabileceği ve lipaz, pepsin ve pankreatinin gibi enzimlerin ilacın salım profilini etkileyebileceği gösterilmiştir. Caco-2 hücre hattı üzerinde yapılan in vitro permeabilite çalışmaları sonucunda ilacın ticari tabletine kıyasla permeabilite katsayısında anlamlı bir artış gözlemlendiği belirtilmiştir. Ayrıca efluks oranının optimize edilen tüm formülasyonlarda 2'den düşük olması, ilacın Caco-2 hücre tek tabakası boyunca permeabilitesinde herhangi bir taşıyıcının etkili olmadığını göstermiştir. Farmakokinetik çalışmalar, PEG ile modifiye edilmiş katı lipit nanopartiküllerin ilacın biyoyararlanımını ticari tabletine oranla yaklaşık 1,5 kat artırdığını göstermiştir.	134
		İrbesartan	Gliseril monostreatat, Poloksamer 407	Solvent emülsifikasyon	363 ± 9,19 - 1129 ± 14,14	41,2 ± 2,69 - 73,8 ± 2,12	Wistar cinsi erkek sıçan	0,1 N HCl ve pH 6,8 fosfat tamponu ortamında gerçekleştirilen in vitro salım çalışmaları sonucu, hazırlanan optimum formülasyondan (F3) ilk 2 saat içerisinde ilacın yaklaşık %20'sinin ve ardından % 97,58'inin 48 saate kadar yavaş yavaş salındığı gösterilmiştir. Oral uygulama sonrası elde edilen farmakokinetik parametreler, optimum formülasyonun ilacın biyoyararlanımını yaklaşık 1,48 kat artırdığını göstermiştir.	135
		Olmesartan medoksomil	Gliseril monostreatat, Poloksamer 188, Poloksamer 407, Tween 80	Sıcak homojenizasyon	80,2 - 595,9	49,23 - 95,89	Wistar cinsi erkek sıçan	Merkezi kompozit tasarımı ile optimum formülasyon parametreleri belirlendikten sonra optimum formülasyon üzerinde ve %1 SLS içeren pH 6,8 fosfat tampon ortamında yapılan in vitro salım çalışmaları, taşıyıcı sistemin 24 saat boyunca ilacın kontrollü salımını sağladığını göstermiştir. Oral uygulama sonrası elde edilen farmakokinetik parametreler, optimum formülasyonun ilacın biyoyararlanımını yaklaşık 2,3 kat artırdığını göstermiştir.	136

Tablo 2.2. Antihipertansif ilaçların oral biyoyararlanımının artırılması amacıyla kullanılan bazı nano taşıyıcı sistemler (Devam-2).

İlaç Taşıyıcı Sistem	Etkin Madde	Kullanılan Yardımcı Maddeler	Hazırlama Yöntemi	Partikül Boyutu (nm)	İlaç Yükleme Kapasitesi (% ± SS)	İn vitro/ex vivo/in vivo Model	Yorum	Kaynak
Dendrimer	Kandesartan sileksetil	Tris (hidroksimetil) aminometan (TRIS), Etilendiamin (EDA), Poliamidoamin (PAMAM)-NH ₂ (Gn.NH ₂), PAMAM-TRIS (Gn.TRIS), PAMAM-COOH (Gn.COOH), Metil akrilat,	Dendrimerlerin sentezinde terminal ucu amin ve TRIS olanlar için divergent sentez kullanılmıştır.				Şişe çalkalama yöntemine göre 24 saat boyunca gerçekleştirilen çözünürlük çalışmaları; PAMAM dendrimerlerinin çözünürlük etkisinin dendrimer konsantrasyonu, jenerasyon sayısı ve terminal fonksiyonel gruplara bağlı olarak değiştiğini göstermiştir. Sonuçlara göre karboksi ve TRIS dendrimerleri ile elde edilen çözünürlük artışı amin dendrimerlerine göre daha fazladır ve en yüksek ilaç çözünürlüğü 2 mM dendrimer konsantrasyonunda elde edilmiştir. Genel olarak jenerasyon sayısı arttıkça taşıyıcı sistemin çözünürlük etkisi de artmıştır.	137
		EDA, Metil akrilat, PAMAM dendrimer	Dendrimer sentezi için iraksak sentez yöntemi kullanılmıştır.				Şişe çalkalama yöntemine göre 48 saat boyunca gerçekleştirilen çözünürlük çalışmaları; sudaki çözünürlüğü 2,63 µg/mL olan kandesartan sileksetil'in çözünürlüğünün kullanılan PAMAM konsantrasyonu ile doğru orantılı olarak arttığını doğrulamıştır. 10 mg/mL dendrimer konsantrasyonunda ilacın çözünürlüğünün maksimum olduğu ve yaklaşık 373 kat arttığı gösterilmiştir.	138
Propranolol		EDA çekirdekli PAMAM dendrimeri, Trietilamin, Lauroil klorür				Caco-2 hücre hattı	Permeabilite çalışmaları G3 ve lauril-G3 PAMAM dendrimerleri ile konjuge edilen propranololün permeabilite katsayısının önemli oranda arttığını ve lauroil-G3 bazlı dendrimer konjugatlarında maksimum olduğunu göstermiştir. Lauroil-G3 bazlı dendrimer konjugatlarının permeabilite katsayısı, G3 bazlı dendrimer konjugatlarının yaklaşık 3,5 katı olarak saptanmıştır.	139
Ramipril Hidroklortiazid		Diaminobütan (DAB) G4.0 PAMAM-NH ₂ , DAB G4.0 PAMAM-OH, DAB G3.5 PAMAM-COONa	İlaç ve dendrimer kompleksi, Faz dengeleme yöntemine (phase equilibration method) göre hazırlanmıştır.				Şişe çalkalama yöntemine göre 24 saat boyunca gerçekleştirilen çözünürlük çalışmalarında; en yüksek ilaç çözünürlüğü %0,8 dendrimer konsantrasyonunda elde edilmiştir. Hidroklortiazid dendrimerin terminal ucu karboksi grubu olduğunda ilacın çözünürlüğü 4,91 kat artarken, Ramipril dendrimerin terminal ucu amin grubu olduğunda ise ilacın çözünürlüğü 3,72 kat artmıştır. In vitro salım çalışmalarına göre, dendrimer formülasyonları saf ilaçlara kıyasla daha hızlı ve tam bir çözünme profili gösterirken ilaç yüklü dendrimer formülasyonları, dendrimer bazlı hibrid formülasyonları ile benzer bir çözünme profili göstermiştir.	140

Tablo 2.2. Antihipertansif ilaçların oral biyoyararlanımının artırılması amacıyla kullanılan bazı nano taşıyıcı sistemler (Devam-3).

İlaç Taşıyıcı Sistem	Etkin Madde	Kullanılan Yardımcı Maddeler	Hazırlama Yöntemi	Partikül Boyutu (nm)	İlaç Yükleme Kapasitesi (% ± SS)	İn vitro/ex vivo/in vivo Model	Yorum	Kaynak
Polimerik misel	Nifedipin	Metoksi poli (etilen glikol) -b- polikaprolakton diblok kopolimer (mPEG-b-PCL)	Çözücü buharlaştırma yöntemi	34,8 ± 3,2 – 40,8 ± 2,9	4,48 ± 0,37 – 18,43 ± 1,06	Wistar cinsi erkek sıçan	Oral uygulama sonrası elde edilen farmakokinetik parametreler, optimum formülasyonun ilacın ticari tabletine kıyasla biyoyararlanımı yaklaşık 2,6 kat artırdığını göstermiştir.	141
	Nimodipin	Poli(ε kaprolakton), PEG 1590, PEG 6000, PEG 10000	Çöktürme yöntemi	45,5 – 595,8	16,7 – 44,42		Triblok kopolimer yapısını oluşturan polikaprolaktonun farklı oranları kullanılarak hazırlanan formülasyonlar üzerinde yapılan çalışmalar; genel olarak polikaprolakton oranı arttıkça misel boyutu ve ilaç yükleme kapasitesinin arttığını fakat ilaç salım oranının azaldığını göstermiştir.	142
	Lasidipin	Pluronic F127, Pluronic P123	Film hidrasyon yöntemi	20,03 ± 0,21 – 58,73 ± 1,56	7,27 ± 0,47 – 99,55 ± 0,18	Albino erkek tavşan	Şişe çalkalama yöntemine göre distile su ve 0,1 M HCl (pH 1,2 tampon) ortamlarında 24 saat boyunca gerçekleştirilen çözünürlük çalışmaları; merkezi kompozit tasarımı ile belirlenen optimum formülasyonun ilacın çözünürlüğünü her iki ortam için de yaklaşık 450 kat artırdığını göstermiştir. In vitro salım çalışmaları, optimum formülasyonun ilaca kıyasla daha hızlı ve 30 dak. içinde %100' e yakın bir çözünme profili sergilediğini göstermiştir. Oral uygulama sonrası elde edilen farmakokinetik parametreler, optimum formülasyonun ilacın oral süspansiyonuna kıyasla biyoyararlanımı yaklaşık 6,85 kat artırdığını göstermiştir.	143
	Olmesartan medoksamil	Pluronic F127, Pluronic P123	İnce film hidrasyon yöntemi	13,73 ± 0,02 – 364,00 ± 30,4	29,5 – 84		pH 6,8 fosfat tampon ortamında (Sorensen's phosphate buffer) ve 37 ± 0,5°C'de gerçekleştirilen salım çalışmaları ilaç süspansiyonuna (% 35) kıyasla polimerik misel formülasyonunun 1 saat boyunca ilacın %70'ini etkin bir şekilde saldırdığını göstermiştir.	144

2.4. Mikronizasyon ve Nanonizasyon

Oral biyoyararlanımın iyileştirilmesinde kullanılan partikül boyutunun azaltılması stratejisi, mikronizasyon ve nanonizasyon olmak üzere iki temel yaklaşımı içermektedir. Çeşitli teknikler kullanılarak etkin madde partikül boyutunun mikron düzeyine düşürülmesine “*mikronizasyon*”, nano boyuta düşürülmesine ise, “*nanonizasyon*” denir. Mikronizasyonda elde edilen partikül boyutu kullanılan tekniğe de bağlı olarak 1-50 µm arasında değişirken, nanonizasyonda 10-1000 nm arasında değişmektedir (103, 145, 146). Özellikle yeni geliştirilen ilaçlar için partikül boyutunun mikron boyutuna düşürülmesi, biyoyararlanımın istenilen düzeyde artırılması için yeterli olmamaktadır. Bu yüzden son zamanlarda partikül boyutunun azaltılması yaklaşımı için mikronizasyon yerini nanonizasyona bırakmıştır. 1 mm boyutunda olan temsili bir kübik partikülün boyutu 10 µm’ye düşürüldüğünde toplam yüzey alanında yaklaşık 100 kat bir artış gözlenirken partikül boyutu 100 nm’ye düşürüldüğünde ise 10000 kat artış gözlemlendiği bildirilmiştir (146, 147). Buna göre partikül boyutunun nanometre boyutuna düşürülmesi, yüzey alanında önemli bir artışa neden olmaktadır ve bu durum Noyes-Whitney eşitliğine göre, tek başına daha yüksek bir çözünme hızı ile sonuçlanmaktadır. Ayrıca Prandtl eşitliğine (Eşitlik 2.3.) göre, nanonizasyon ile birlikte azalan difüzyon mesafesine (h_H) de bağlı olarak partikül etrafında daha yüksek bir konsantrasyon gradyanı oluşmaktadır ve çözünme hızında beklenenin üzerinde bir artış sağlanmaktadır (1, 146, 148).

$$h_H = k(L^{1/2}/V^{1/2}) \quad (2.3.)$$

h_H : Hidrodinamik sınır tabaka kalınlığı, k: Sabit, L: Akış yönünde yüzey, V: Akan bir sıvının düz bir yüzeye göre bağlı hızı

Oral biyoyararlanımın iyileştirilmesinde önemli olan bir diğer faktör ilaç etkin maddesinin doyumluk çözünürlüğüdür (C_s). C_s , sadece ilaca, çözücüye ve sıcaklığa bağlı değil aynı zamanda partikül boyutu 1 µm’nin altında olduğunda, partikül boyutuna da bağlı bir değişkendir. Bu durum Ostwald-Freundlich eşitliği (Eşitlik 2.4.) ile açıklanmakla birlikte nanonizasyon ile ilacın doyumluk çözünürlüğünün önemli ölçüde artırılacağı bildirilmiştir (146, 149). Ayrıca, artan doyumluk çözünürlüğünden dolayı, bağırsak lümeni ve kan arasındaki

konsantrasyon gradyanı arttığı için pasif difüzyonla emilim de önemli ölçüde artmaktadır (98, 146). Sonuç olarak, biyoyararlanımdaki iyileşme, mikronizasyonda sadece yüzey alanındaki artışa bağlı olarak çözünme hızındaki artış ile gerçekleşirken, nanonizasyonda hem daha fazla artan yüzey alanı ve azalan difüzyon mesafesine hem de artan doygunluk çözünürlüğüne bağlı olarak çözünme hızındaki artış sayesinde gerçekleşmektedir. Suda çözünürlük problemi yaşayan ilaçların mikrokristal formlarının oral absorpsiyonunda hız kısıtlayıcı basamak çözünme iken, nanokristal formlarının oral absorpsiyonunda hız kısıtlayıcı basamak permeabilitedir (150).

$$\ln(S/S_0)=2M \gamma/\rho rRT \quad (2.4.)$$

S: r çapındaki partiküllere sahip etkin maddenin T sıcaklığındaki doygunluk çözünürlüğü, S₀: Etkin maddenin partikül büyüklüğünün sonsuz olduğu (r: ∞) durumdaki doygunluk çözünürlüğü, M: Etkin maddenin molekül ağırlığı, γ: Yüzeyler arası gerilim, ρ: Etkin maddenin yoğunluğu, r: Etkin maddenin partikül çapı, R: Gaz sabiti, T: Mutlak sıcaklık

Fu ve ark., (80) işlem görmemiş nisoldipinin, katı dispersiyonu (sıcak eriyik ekstrüzyon tekniği (hot melt extrusion) ile hazırlanmış, T5), mikrokristal formülasyonu (jet öğütme tekniği ile hazırlanmış, T1) ve farklı stabilizan sistemleri/oranları ve farklı öğütme sürelerine göre (yaş öğütme tekniği ile) hazırlanmış oldukları nanokristal formülasyonlarını (T2, T3 ve T4) çeşitli in vitro ve in vivo çalışmalarla karşılaştırmıştır. Sprague Dawley cinsi erkek sıçanlar üzerinde yapılan in vivo oral biyoyararlanım çalışmalarından elde edilen farmakokinetik parametreler, katı dispersiyon ve mikrokristal formülasyonların oral biyoyararlanımının genel olarak birbirine yakın olmakla birlikte nanokristal formülasyonlarından düşük olduğunu göstermiştir. Ayrıca T1'e kıyasla, polivinil prolidon (PVP K30; %1,25, a/h) ile 15 dak.'lık bir öğütme süresi kullanılarak hazırlanan T3'ün ve PVP K30-Sodyum lauril sülfat (SLS) stabilizan kombinasyonu (PVP K30:SLS, %1,25:0,4) ile 80 dak.'lık bir öğütme süresinde üretilen T4'ün oral biyoyararlanımının sırasıyla 5,1 ve 7,1 oranında arttığı gözlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışma özellikle çözünürlük sorunu sebebiyle oral biyoyararlanım problemi yaşayan ilaçlar için nanonizasyonun ne kadar önemli olduğunu vurgulamıştır (80).

2.5. Nanokristal Teknolojisi

NKT, ilk kez 1990'lı yılların başında keşfedilmesinin ardından 2000 yılından itibaren hızlı bir şekilde ilaç piyasasında yerini alan ve genel olarak çözünürlük problemi yaşayan ilaçlara uygulanan evrensel bir yaklaşımdır. İlaç nanokristalleri, genel olarak çeşitli yöntemler kullanılarak partikül boyutu nano boyuta düşürülmüş kristal yapıdaki partiküller olarak tanımlanmaktadır ve bu sistemleri nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerden ayıran en belirgin özellik herhangi bir taşıyıcı içermemeleri ve bu sayede neredeyse %100'e yakın ilaç etkin maddesinden oluşmasıdır (98). NKT kullanılarak elde edilen partikül boyutu aralığına ilişkin literatürde farklı tanımlamalar mevcuttur. Bu teknolojiye ait ilk patentte elde edilen kristal yapıların boyutunun 10-1000 nm arasında olduğu belirtilirken, Keck ve ark. (151) kristal yapıların boyutunun 1 µm'nin altında olmasının yanında tipik olarak 200-500 nm arasında değiştiğini belirtmiştir (152). İlaç nanokristallerinin bir sıvı ortam içerisinde dağılması sonucu oluşan dispersiyon "*nanosüspansiyon*" olarak adlandırılmaktadır ve bir nanosüspansiyon formülasyonu temelde etkin madde, stabilizan ve dispersiyon ortamından oluşmaktadır. Dispersiyon ortamı olarak su, sulu çözeltiler ve susuz ortamlar (Polietilen glikol (PEG) ve yağlar) kullanılırken sistemi stabilize etmek amacıyla çeşitli yüzey aktif madde ve polimerik yapıdaki stabilizanlar kullanılmaktadır (98).

NKT'nin son yıllarda ön plana çıkmasının nedeni aşağıda belirtilen birçok üstünlüğe sahip olmasındandır.

I) Kullanılan ilacın doygunluk çözünürlüğünü, çözünme hızını ve hücre membranlarına tutunma oranını artırması ile oral biyoyararlanımda belirgin ölçüde bir artış sağlaması,

II) Yüksek oranda ilaç içermesi sayesinde kullanılan dozun azaltılabilmesi ve buna bağlı olarak ilacın sistemik yan etki profilinin azalmasına olanak sağlaması,

III) Basit, hızlı ve tekrarlanabilir üretim prosesi sayesinde ölçek büyütme (scale-up) için uygun bir teknoloji olması,

IV) Formülasyon için kullanılan yardımcı madde gereksiniminin az olması sayesinde üretim maliyetinin diğer sistemlere göre daha düşük olması,

V) Mikronize edilmiş ilaçların aksine birçok yol (parenteral, pulmoner, topikal ve oftalmik) ile uygulanabilmesi ve çeşitli yöntemlerle kolayca sterilize edilebilmesi,

VI) Doz orantısallığını iyileştirebilmesi,

VII) Özellikle suda çözünürlüğü az olan lipofilik ilaçlarda gözlenen açıklıktokluk durumlarındaki biyoyararlanım farklılıklarının ve bireyler arası değişkenliğin azaltılabilesine olanak sağlamasıdır (98, 145, 153, 154, 155).

Ayrıca NKT'inde sistemi stabilize etmek amacıyla formülasyona eklenen tween 80, d-alfa-tokoferil poli (etilen glikol) 1000 süksinat (TPGS)(TPGS, FDA onaylı suda çözünen bir stabilizandır), poloksamer 188 (pluronik F68) gibi noniyonik sürfaktanların etkin maddenin permeabilitesini, P-gp inhibisyonuna neden olarak artırabileceği ve verapamil veya siklosporin A gibi düşük molekül ağırlıklı P-gp inhibitörlerinin aksine biyolojik ortam için olumsuz bir etkiye neden olmayacağı bildirilmiştir (156-159). TPGS içindeki PEG zincirlerinin inhibitör aktivite üzerinde etkisinin olmasının yanı sıra en iyi inhibitör aktivite 1100-1500 Da uzunluğuna sahip PEG zincirlerinde gözlenmiştir (158, 160). NKT'ne karşı son zamanlarda artan ilgi, endüstriyel olarak uygulanabilir üretim teknikleri ile üretilmesi sayesinde ürüne dönüşebilme ihtimali yüksek formülasyonların hazırlanabilmesi ile ilişkilendirilmiştir. Bu tür üstünlüklerin haricinde tüm etkin maddelere uygulanamaması, kullanılan yöntemle bağlı olarak uygulanan yüksek basınç ve sıcaklığın etkisiyle etkin madde ya da stabilizanların polimorfik dönüşüme uğraması, dispersiyon halinde fiziksel stabilitenin korunmasının zorluğu ve kurutma aşamasında görülen partikül büyümesi gibi durumlar NKT'nin sınırlamalarıdır (100).

Antihipertansif ilaçların NKT ile formüle edilmesine ilişkin literatürde birçok çalışma bulunmasına rağmen günümüzde bu teknoloji ile üretilip ticarileşen çok fazla ürün bulunmamaktadır. Günümüzde bu teknoloji ile ıslak öğütme tekniği kullanılarak üretilmiş, KKB'leri sınıfında yer alan verapamil ve diltiazemi içeren

Verelan PM[®] kapsül ve *Herbesser*[®] tablet ticarileşen ürünlerdir. *Verelan PM*[®] kapsül, Schwarz Pharma firması tarafından geliştirilip 1998 yılında ve *Herbesser*[®] tablet Mitsubishi Tanabe Pharma firması tarafından geliştirilip 2002 yılında FDA'den onay alarak ilaç piyasasında yerini almıştır (26, 161, 162). Literatürde NKT'nin antihipertansif ilaçlardan daha çok KKB'leri ve anjiyotensin reseptör blokörleri üzerine yoğunlaştığı görülmektedir.

2.5.1. Nanokristal Teknolojisinde Stabilizasyon

Nanokristallerin en önemli özelliklerinden biri uzun bir dönem kararlılığa sahip olmalarıdır. Etkin madde boyutunun nano boyuta indirilmesi sonucu sistemde artan spesifik yüzey enerjisine bağlı olarak oluşan termodinamik kararsızlığı minimuma indirmek amacıyla partiküller bir araya gelerek agregat oluşturma eğilimi göstermektedir. Bu yüzden ilaç nanokristalleri, çoğu zaman yüzey aktif madde ve polimerik yapıdaki stabilizanlar veya bunların kombinasyonu ile stabilize edilme ihtiyacı duymaktadır (98).

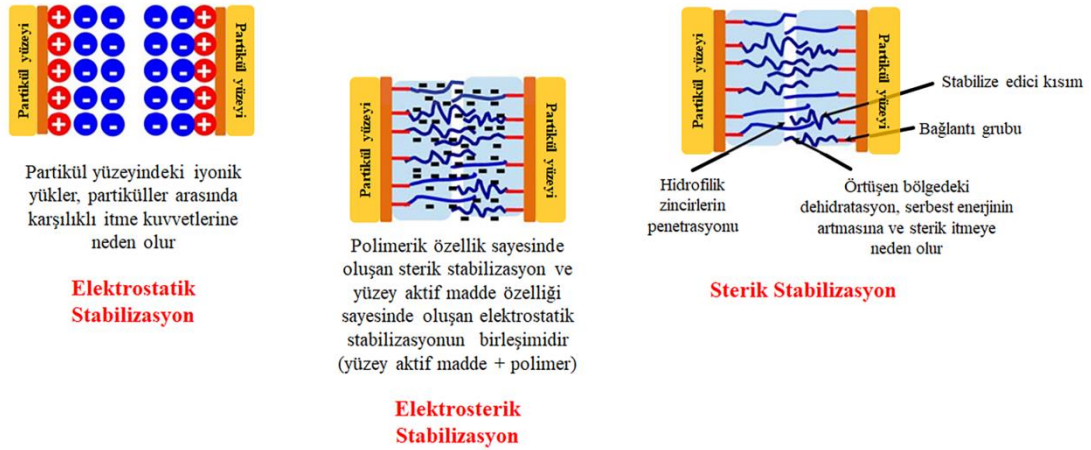
Agregasyon ve Çarpışma Mekanizmaları

Literatürde olası agregasyon mekanizmaları; perikinetik agregasyon, diferansiyel sedimentasyon ve ortokinetik agregasyon olmak üzere üç ana başlık altında sınıflandırılmıştır. Perikinetik agregasyon, Brown hareketleri ile indüklenen agregasyonu ifade etmektedir. 5 µm'nin altında partikül büyüklüğüne sahip partiküllerin dispersiyon ortamındaki rastgele hareketleri olan Brown hareketleri sonucu partiküller birbiriyle çarpışmakta ve aralarında oluşan elektrostatik çekim kuvvetleri nedeniyle birbirine yapışarak agregatlar oluşturmaktadır. Başka bir ifadeyle perikinetik agregasyon çoklu çarpışmalar sonucu oluşan agregasyondur. Diferansiyel sedimentasyon, farklı çap ve yoğunluktaki partiküller tarafından indüklenen agregasyonu ifade etmektedir. Farklı çap ve yoğunluktaki partiküller farklı hızlarda hareket etmektedir ve dispersiyon ortamında daha hızlı hareket eden parçacıklar daha yavaş hareket eden parçacıklara çarpmaktadır. Bu çarpışmalar partiküllerin topaklanarak sedimentasyonuna neden olmaktadır. Ortokinetik agregasyon ise, kayma güçleri tarafından indüklenen agregasyonu ifade etmektedir. Dispersiyonun hareketinden ötürü meydana gelen partikül taşınması, parçacık içi

çarpışmalarda artışa neden olmaktadır ve bu şekilde meydana gelen agregasyon ortokinetik agregasyon olarak adlandırılmaktadır. Ortokinetik agregasyonun, partikül boyutu ve hız gradyanından etkilenmesinin aksine sıcaklıktan bağımsız olduğu bildirilmiştir (162).

Stabilizasyon Mekanizmaları

Bir nanosüspansiyon formülasyonunun stabilitesi, etkin maddenin morfolojisi, miktarı (ilaç konsantrasyonu), Log P değeri, erime noktası, çözünürlüğü gibi etkin maddeye ait özellikler, stabilizan türü, oranı ve kombinasyonları gibi kullanılan stabilizanalara ait özellikler ve hazırlanma sırasında kullanılan öğütme enerjisinin şiddeti, öğütme süresi ve hızı, öğütmede kullanılan bilyelerin büyüklüğü ve öğütme haznesini kapladığı alan (hacmi) gibi yönteme ait parametrelere bağlı olarak değişmektedir (163-167). NKT'nde agregasyonu engelleyerek sistemin fiziksel stabilitesinin sağlanmasında ve korunmasında kullanılan stabilizanlar, temel olarak partikül yüzeyine kendiliğinden adsorblanmakta ve yüzeyler arası gerilimi düşürerek sistemde artan serbest yüzey enerjisini azaltmaktadır. Stabilizanların serbest yüzey enerjisini azaltarak sisteme termodinamik açıdan kararlılık kazandırma mekanizmaları literatürde temelde elektrostatik, sterik ve elektrosterik stabilizasyon olmak üzere üç ana başlık altında sınıflandırılmıştır (162, 163). Elektrostatik stabilizasyon, stabilizanların iyonize olabilen gruplarının partikülün yüzeyini yükleyerek itici bir kuvvet oluşturması sonucu oluşurken, sterik stabilizasyon, stabilizanların hidrofobik partiküller etrafında yoğun bir hidrofilik tabaka oluşturarak partiküller arasında sterik engel ve güçlü bir itme meydana getirmesi ile oluşmaktadır. Elektrosterik stabilizasyon ise, polimerik özellik sayesinde oluşan sterik stabilizasyon ve yüzey aktif madde özelliği sayesinde oluşan elektrostatik stabilizasyonun birleşimi ile meydana gelmektedir. NKT'nde yüzey aktif özellikte ve polimerik yapıda olan stabilizanların kombinasyonlarının kullanımı daha etkili bir stabilizasyon için sıklıkla tercih edilmektedir (162). Stabilizanların sisteme kararlılık kazandırma mekanizmaları Şekil 2.2.'de verilmiştir.



Şekil 2.2. Stabilizanların sisteme kararlılık kazandırma mekanizmaları (162).

2.5.2. Nanokristal Teknolojisinde Kullanılan Stabilizanlar

İlaç nanokristallerinin hazırlanmasında en kritik aşama stabilizan sisteminin türü ve oranının belirlenmesidir (162). Stabilizan sisteminin seçimi, daha çok yapılan deneysel çalışmalar neticesinde belirleniyor gibi görünse de stabilizanların hidrofobik partikül yüzeylerine olan ilgisinin varlığı ve adsorpsiyon mekanizmalarına ilişkin daha önceden yapılan çalışmalar formülasyon çalışmalarını hızlandırabilmektedir (166). NKT’inde genel olarak, PVP, polivinil alkol (PVA), hidroksi propil metil selüloz (HPMC), hidroksi propil selüloz (HPC), hidroksi etil selüloz (HEC), sodyum karboksi metil selüloz (NaCMC), sodyum aljinat (Na aljinat), kitosan, PEG türevleri, SoluPlus[®], Kollidon[®] VA 64 gibi polimerik stabilizanlar ve SLS, sodyum dokusat (SD), sodyum deoksikolat (SDC), poloksamerler (pluronikler), tween 80, TPGS gibi yüzey aktif özellikteki stabilizanlar kullanılmaktadır (66, 162). PVP, PVA, HPMC ve HPC gibi polimerler partikül yüzeyine hidrojen bağları ile adsorplanarak hidrofilik bir sınır tabakası oluşturabilmektedir. PVP ve HPC’nin polar fonksiyonel grup içermeyen hidrofobik ilaç yüzeyleri için fiziksel adsorpsiyon ve sterik stabilizasyonun sağlanmasında ideal oldukları bildirilmiştir. Fakat yüzey aktif maddelere ve poloksamerler (poloksamer 407, poloksamer 188) gibi hem hidrofilik hem de hidrofobik zincir içeren amfifilik kopolimerlere kıyasla daha zayıf özellikte stabilizan oldukları belirtilmiştir. Amfifilik blok kopolimerler, genellikle homopolimerlere kıyasla daha iyi stabilizasyon sağlamakla birlikte, bu etkiyi hidrofobik kısımları ile partikülün yüzeyine hidrofobik

etkileşimler sayesinde adsorbe olurken, hidrofilik kısımları ile partikülü sararak sterik bir engel oluşturmaları suretiyle gerçekleştirmektedir (168). Ayrıca kullanılan polimerlerin morfolojik yapısı, molekül ağırlığı ve taşıdığı fonksiyonel gruplar elde edilen partikül büyüklüğünü ve sistemin stabilitesini etkilemektedir (162). Lee ve ark. (169) yapmış oldukları bir çalışmada, başarılı bir polimer adsorpsiyonun sağlanması ve partikül boyutunun küçültülmesi için polimerin hidrofilik/hidrofobik oranın önemli olduğunu ve hidrofobik kısımların mol fraksiyonunun en az %15 mol olması gerektiğini belirtmiştir.

Nanokristal formülasyonlarında dikkat edilmesi gereken diğer bir önemli parametre kullanılan stabilizanın miktarı ve oranıdır. Stabilizan miktarı yetersiz olduğunda agregasyon sorunu yaşanırken, fazla olması durumunda ise kristal büyümesi (Ostwald Ripening Etkisi; Ostwald olgunlaşması) görülmektedir. Ostwald olgunlaşması, temelde farklı boyuttaki partiküllerin çözünürlük farkına bağlı olarak gerçekleşen bir stabilite sorunudur. Özellikle partikül büyüklüğü dağılım aralığı geniş olan sistemlerde küçük partiküller üzerinde serbest yüzey enerjisi daha yüksektir. Bu partiküller ortamda büyük olan partiküllere nazaran daha fazla çözünmekte ve daha büyük partiküller halinde kristallenmektedir. Ayrıca bu kristallenmeye sistemde kristal ve amorf yapının birlikte kullanılması ve sıcaklık değişimleri gibi durumlar da neden olabilmektedir. Ostwald olgunlaşmasının engellenebilmesi için; partikülün en dayanıklı kristal şeklinin kullanılması, aşırı sıcaklık değişimlerinden kaçınılması ve partikül büyüklüğü dağılım aralığı dar olan sistemlerin hazırlanması önerilmektedir. Ayrıca hazırlama aşamasında kullanılan çöktürme sıcaklığı gibi yöntem parametrelerinin de kristal büyümesi üzerine etkisi bulunmaktadır. Xia ve ark. (71) yapmış oldukları bir çalışmada çöktürme-ultrasonikasyon yöntemine göre; 3°C ve 35°C olmak üzere iki farklı çöktürme sıcaklığında nitrendipin nanokristalleri hazırlamış ve sıcaklığın 35°C'den 3°C'ye düşürülmesi ile partikül boyutunun 4,43 µm'den 211 nm'ye azaldığını saptamıştır. Yüksek sıcaklıkta daha büyük partiküllerin elde edilmesi başlıca iki nedene dayandırılmıştır. Birincisi; sıcaklığın yükselmesinin nitrendipinin çözünürlüğünün artmasına neden olması ve karıştırma sırasında süpersaturasyon seviyelerinin azalarak ve daha düşük çekirdeklenme oranına bağlı olarak kristal büyümesine neden olmasıdır. İkincisi ise; daha yüksek bir sıcaklıkta kristalin arayüzeyinde daha yüksek

bir difüzyon ve artan reaksiyon kinetiğine bağlı olarak kristal büyümesinin daha hızlı gerçekleşmesidir (71). Nanokristal formülasyonlarında kullanılan ilaç:stabilizan oranları genellikle 1:20 den 20:1 oranına kadar geniş bir ölçüde değişkenlik göstermektedir (170, 171).

Nanokristal formülasyonlarında stabilizasyonun sağlanması amacıyla kullanılan başka bir strateji, sinerjik etki sağlamak amacıyla polimer-yüzey aktif madde ve polimer-polimer kombinasyonlarının kullanılmasıdır. Ayrıca stabilizan kombinasyonları, oluşan nanokristallerin boyutunu ve dağılımını da etkilemektedir. Bilgili ve ark. (172) yapmış oldukları bir çalışmada ıslak öğütme tekniğini kullanarak hazırladıkları griseofulvin nanosüspansiyonlarında polimer ve yüzey aktif madde kombinasyonunda bu stabilizanların ayrı ayrı kullanılmasına kıyasla daha iyi partikül büyüklüğü dağılımı ve daha küçük partiküller elde edildiğini bildirmiştir. Meruva ve ark. (167) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ıslak öğütme tekniğine göre hazırlanan irbesartan nanokristallerinde kullanılan ilaç konsantrasyonu (%5-10, a/a), stabilizan türü (tween 80, poloksamer 407, poloksamer 188) ve ilaç:stabilizan oranının (10:0,6, 10:1) sistemin partikül boyutu ve dağılımının yanı sıra ilacın stabilitesini nasıl etkilediği araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre; ilaç konsantrasyonu ile partikül boyutu arasında negatif bir korelasyon gözlenmiştir. Yani ilaç konsantrasyonu arttıkça, ilaç-ilac partikülleri ve ilaç-bilyeler arasındaki çarpışma sayısının artmasına bağlı olarak daha küçük partikül boyutu elde edilmiştir. Kullanılan stabilizanın türü ve oranı istatistiksel olarak partikül boyutu üzerinde önemli bir etkiye sahip olmakla birlikte en küçük boyutlar poloksamer 407'nin %1 oranında kullanıldığı formülasyonlarda elde edilmiştir ve bu sonuçlar poloksamer 407'nin diğer stabilizanalara kıyasla daha iyi yüzey aktif madde özelliklerine sahip olmasına bağlanmıştır. Ayrıca tween 80 ve poloksamer 188 kullanılan formülasyonlarda stabilizan oranı arttıkça partikül boyutunun arttığı saptanmıştır. Genel olarak nanokristal formülasyonlarında önemli bir parametre olan ilaç:stabilizan oranı bu çalışmada önemli bir parametre olarak bulunmamıştır. Yapılan kısa dönem stabilite çalışmaları ise irbesartanın %10 (a/a) ve poloksamer 407'nin %1 oranında kullanıldığı formülasyonların diğer formülasyonlara kıyasla fiziksel olarak daha stabil olduğunu göstermiştir (167). NKT kullanılarak hazırlanan

diğer antihipertansif ilaç formülasyonlarında kullanılan stabilizanlar ve oranları Tablo 2.3.'de özetlenmiştir.

Tablo 2.3. Antihipertansif ilaçların nanokristal bazlı formülasyonlarında kullanılan yöntemler ve formülasyon bileşenleri.

Sınıf	Etkin Madde	Nanokristal Hazırlama Tekniği	Stabilizan	Etkin Maddenin Başlangıç Partikül Boyutu (μm)	Elde Partikül Boyutu (nm)	Edilen Boyutu	Yorum	Kaynak
Anjiyotensin Reseptör Blokörleri	İrbesartan (%10, a/a)	Islak Öğütme	Poloksamer 407 (%1 a/a)		246		pH 2 (0,01 N HCl) ve pH 6,8 fosfat tamponu ortamlarında pedal yöntemine göre (USP Type II Apparatus - 75 rpm - 900 mL çözünme ortamı - 37°C \pm 0,5°C) gerçekleştirilen in vitro çözünme çalışmaları, hazırlanan optimum formülasyonun irbesartan süspansiyonuna kıyasla her iki ortam için de (ilk 2 dak. içinde %100'e yakın çözünme) yaklaşık 1 saat boyunca etkili bir çözünme profili sergilediğini göstermiştir.	167
	Kandesartan sileksetil (%0,5, a/h)	Çözücü-Antiçözücü çöktürme	HPMC E3 : Pluronik F127 (50:50, a/a) (%0,5, a/h)		159 \pm 8,1		Şişe çalkalama yöntemine göre distile su, 0,1 N HCl ve pH 6,8 fosfat tamponu ortamlarında 24 saat boyunca gerçekleştirilen çözünürlük çalışmaları nanokristal formülasyonunun her 3 ortam için de ilacın doyumluk çözünürlüğünde önemli bir artış sağladığını göstermiştir. %0,15 oranında Polisorbat 20 içeren pH 6,8 fosfat tamponu ortamında pedal yöntemine göre (USP Type II Apparatus - 50 rpm - 900 mL çözünme ortamı - 37,5°C \pm 0,5°C) gerçekleştirilen in vitro çözünme çalışmaları, nanokristal formülasyonlarının saf etkin madde ve ilacın ticari preparatına kıyasla ilacın çözünme profilini iyileştirdiğini göstermiştir (İlk 10 dak. içinde %80 civarına ulaşan çözünme 1 saat boyunca %100'e yakın seyretmiştir). 4 saat boyunca gerçekleştirilen Caco-2 permeabilite çalışmaları nanokristal formülasyonu için hesaplanan yüzde geçirgenlik oranının etkin maddeye kıyasla yaklaşık 4 kat arttığını göstermiştir. Sprague Dawley cinsi dişi sıçanlarda yapılan in vivo biyoyararlanım çalışmalarından elde edilen farmakokinetik parametreler ilacın oral biyoyararlanımının yaklaşık 4 kat arttığını göstermiştir.	63
	Alisartan izoproksil (%5, a/h)	Islak Öğütme ve Püskürterek kurutma	PVP K30 (%0,1, a/h)		300,5 \pm 2,2	Püskürterek kurutma sonrası optimum formülasyon için (F16) 304,0 \pm 14,8	Püskürterek kurutulmuş optimize nanokristal formülasyonu ile (F16) ilacın yükleme kapasitesinin artırıldığı (%61,7) ve elde edilen katı nanokristallerin yüksek oranda redisperse olduğu saptanmıştır. pH 6,8 fosfat tampon ortamında pedal yöntemine göre (USP Type II Apparatus - 50 rpm - 900 mL çözünme ortamı - 37,5°C \pm 0,5°C) gerçekleştirilen in vitro çözünme çalışmaları, optimize nanokristal formülasyonların saf etkin maddeye kıyasla ilacın çözünme profilini iyileştirdiğini göstermiştir (1 saatte saf ilaç %10 civarına çözünürken püskürterek kurutulmuş nanokristal formülasyonu %14 çözünmüştür). Sprague Dawley cinsi erkek sıçanlarda yapılan in vivo oral biyoyararlanım çalışmalarından elde edilen farmakokinetik parametreler ilacın oral biyoyararlanımının saf etkin maddeye kıyasla yaklaşık 4,73 kat arttığını göstermiştir.	173

Tablo 2.3. Antihipertansif ilaçların nanokristal bazlı formülasyonlarında kullanılan yöntemler ve formülasyon bileşenleri (Devam-1).

Sınıf	Etkin Madde	Nanokristal Hazırlama Tekniği	Stabilizan	Etkin maddenin Başlangıç Partikül Boyutu (µm)	Elde Partikül Boyutu (nm)	Edilen Boyutu	Yorum	Kaynak
Beta blokörler	Atenolol (% 0,125, a/h)	Yüksek basınçlı homojenizasyon	SLS (%1,25 a/h)		125,6		Atenolol nanokristalleri ve nanokristalleri içeren kapsül formülasyonu için in vitro salım çalışmaları pH 6,8 fosfat tamponu ortamında gerçekleştirilmiştir ve 2 saatin sonunda saf atenolele kıyasla tüm nanokristal formülasyonları için ilacın çözünme oranında (%78,30-98,28 aralığında) belirgin bir artış olduğu gözlenmiştir. In vitro permeabilite çalışmaları sakrifiye edilen bir keçiden alınan ince bağırsağın duodenal kısmı üzerinde gerçekleştirilmiş olup 60 dak. sonunda nanokristal formülasyonlarının geçirgenlik yüzdesinin (%90,88) işlem görmemiş ilaca (%31,22) kıyasla çok daha yüksek olduğunu göstermiştir.	38
Kalsiyum kanal blokörleri	Nifedipin (%5, a/h)	Yüksek basınçlı homojenizasyon	HPMC (Methocel E15) (%0,5, a/a)	98,7 ± 0,4	291 ± 0,006		3 saat boyunca gerçekleştirilen çözünürlük çalışmaları nifedipinin doyumluk çözünürlüğünün nanokristal teknolojisi ile yaklaşık 1,5 kat arttığını göstermiştir. %0,05 polisorbata 20 içeren deiyonize su ortamında pedal yöntemine göre (Apparatus Type II - 60 rpm - 900 mL çözünme ortamı - 37°C ± 1°C) gerçekleştirilen çalışmalar hazırlanan nifedipin nanokristallerinin ilacın dissolüsyon profilini iyileştirdiğini göstermiştir.	69
	Nifedipin (%0,1, a/h)	Islak Ögütme	HPC SSL (%1, a/h), Poloksamer (%0,1, a/h)	14	302	407	Pepsin içermeyen pH 1,2 simüle gastrik çözünme ortamında pedal yöntemine göre (USP Type II Apparatus -100 rpm - 500 mL çözünme ortamı - 37°C ± 0,5°C) gerçekleştirilen in vitro çözünme çalışmaları, nanokristal formülasyonlarının ilacın saf hali ve ticari preparatına (nifedipin kapsül) kıyasla yaklaşık 1 saat boyunca daha etkili bir çözünme profili sergilediğini göstermiştir (Nanopsüspanسیون formülasyonunda ilk 15 dak içinde etkin maddenin yaklaşık %85'i çözünmüştür).	66
	Lasidipin (%0,1, a/h)	Çözücü-Antiçözücü sonopresipitasyon	SDC (%100, a/h), Pluronik F127 (/0,1, a/h)		273,21		0,1 M HCl (pH 1,2 tampon) ve distile su ortamlarında 24 saat boyunca gerçekleştirilen çözünürlük çalışmaları nanokristal teknolojisi ile ilacın doyumluk çözünürlüğünün her iki ortam için de yaklaşık 70 kat arttığını göstermiştir. pH 1,2 / 0,1 M HCl tampon ortamında pedal yöntemine göre (USP Type II Apparatus - 100 rpm - 100 mL çözünme ortamı - 37°C ± 1°C) gerçekleştirilen in vitro çözünme çalışmaları, hazırlanan optimum formülasyonun (N3) ilacın çözünme hız profilinde belirgin bir artış sağladığını göstermiştir.	174

Tablo 2.3. Antihipertansif ilaçların nanokristal bazlı formülasyonlarında kullanılan yöntemler ve formülasyon bileşenleri (Devam-2).

Sınıf	Etkin Madde	Nanokristal Hazırlama Tekniği	Stabilizan	Etkin Maddenin Başlangıç Partikül Boyutu (µm)	Elde Edilen Partikül Boyutu (nm)	Yorum	Kaynak
Kalsiyum kanal blokörleri	Nimodipin %0,7, a/h)	Mikroçöktürme ve Yüksek basınçlı homojenizasyon	Poloksamer (Lutrol®) (%0,4, a/h), HPMC E5 (%0,1, a/h), SDC (%0,05, a/h)	407	159	Şişe çalkalama yöntemine göre 37°C'de ve farklı çözünme ortamlarında (distile su, %0,05 ve %0,3 SLS içeren distile su ve Fasted State Simulated Intestinal Fluid (FaSSIF)) 72 saat boyunca gerçekleştirilen çözünürlük çalışmaları, hazırlanan nanokristal formülasyonlarının (Nano-1, Nano-2 ve Nano-3) ilacın doyumluk çözünürlüğünde belirgin bir artış sağladığını göstermiştir. Pedal yöntemine göre farklı çözünme ortamlarında (USP Apparatus II - 50 rpm - 900 mL, çözünme ortamları; distile su, %0,05 ve %0,3 SLS içeren distile su ve FaSSIF, 37°C) gerçekleştirilen in vitro çözünme çalışmaları, hazırlanan nanokristal formülasyonlarının ilacın ticari tabletine (Nimotop®; katı dispersiyon yöntemine göre hazırlanmış) kıyasla daha düşük bir çözünme profili sergilediğini göstermiştir. Beagle cinsi erkek köpekler üzerinde yapılan in vivo oral biyoyararlanım çalışmaları optimize nanokristal formülasyonlarının (Nano-1 ve Nano-3) ilacın ticari tabletine kıyasal oral biyoyararlanımı yaklaşık 2,6 kat artırdığını göstermiştir.	175
	Nimodipin %0,7, a/h)	Mikroçöktürme ve Yüksek basınçlı homojenizasyon	Poloksamer (Lutrol®) (%0,4, a/h), HPMC E5 (%0,1, a/h), SDC (%0,05, a/h)	407	833,3 ± 20,6	%0,1 (a/h) ve %0,2 (a/h) oranında SLS içeren pH 6,8 fosfat tamponu ortamında pedal yöntemine göre (Apparatus II - 100 rpm - 900 mL çözünme ortamı - 37°C ± 0,5°C) gerçekleştirilen in vitro çözünme çalışmaları, hazırlanan optimum formülasyonun saf nimodipine kıyasla çözünme hız profilinde belirgin bir artış sağladığını göstermiştir. Sprague-Dawley cinsi erkek sıçanlar üzerinde yapılan in vivo oral biyoyararlanım çalışmaları optimize nanokristal formülasyonunun ilacın ticari tabletine (Nimotop®) kıyasla oral biyoyararlanımı yaklaşık 4 kat artırdığını göstermiştir.	176
	Nitrendipin (%0,3, a/h)	Presipitasyon ve Ultrasonikasyon	PVA (%0,15, a/h)	36,6	209 ± 9	48 saat boyunca gerçekleştirilen çözünürlük çalışmaları nitrendipinin doyumluk çözünürlüğünün NKT ile artırıldığını göstermiştir. %0,1 (a/h) oranında SLS içeren pH 1,2 / 0,1 M HCl tamponu ortamında pedal yöntemine göre (Apparatus III - 100 rpm - 200 mL çözünme ortamı - 37°C ± 0,5°C) gerçekleştirilen in vitro çözünme çalışmaları, hazırlanan optimum formülasyonun ilacın çözünme hız profilinde belirgin bir artış sağladığını göstermiştir (1 saat içinde %100'e yakın bir çözünme). Wistar cinsi erkek sıçanlar üzerinde yapılan in vivo oral biyoyararlanım çalışmaları optimize nanokristal formülasyonun ilacın ticari tabletine kıyasla oral biyoyararlanımı yaklaşık 5 kat artırdığını göstermiştir.	71

Tablo 2.3. Antihipertansif ilaçların nanokristal bazlı formülasyonlarında kullanılan yöntemler ve formülasyon bileşenleri (Devam-3).

Sınıf	Etkin Madde	Nanokristal Hazırlama Tekniği	Stabilizan	Etkin Maddenin Başlangıç Partikül Boyutu (μm)	Elde Edilen Partikül Boyutu (nm)	Yorum	Kaynak
Kalsiyum kanal blokörleri	Nitrendipin (%10, a/h)	Çöktürme ve Yüksek basınçlı homojenizasyon	PVA (%0,1, a/h)		175 ± 13	%70 HCl (0,1 mol/L) ve %30 etanol (h/h) içeren çözünme ortamında (Chinese Pharmacopeia 2010; pedal yöntemi - 100 rpm - 900 mL çözünme ortamı - 37°C ± 0,5°C) gerçekleştirilen in vitro çözünme çalışmaları, hazırlanan optimum formülasyonun fiziksel karışım ve ilacın ticari preparatına kıyasla çözünme hız profilinde belirgin bir artış sağladığını göstermiştir (İlk 1 dak. içinde %100'e yakın bir çözünme). Wistar cinsi erkek sıçanlar üzerinde yapılan in vivo oral biyoyararlanım çalışmaları optimize nanokristal formülasyonun ilacın ticari tabletine kıyasla oral biyoyararlanımı yaklaşık 10 kat artırdığını göstermiştir.	74
	Nisoldipin (%5, a/h)	Islak Öğütme	PVP K30 (%1,25, a/h), SLS (%0,4, a/h)		240,3	%3 (a/h) oranında SLS içeren çözünme ortamında (Chinese Pharmacopeia; pedal yöntemi - 50 rpm - 900 mL çözünme ortamı - 37°C ± 0,5°C) gerçekleştirilen in vitro çözünme çalışmaları, saf etkin maddeye kıyasla nanokristal formülasyonlarının (10 dak.'da %80'e yakın çözünme) ilacın çözünme profilini belirgin şekilde iyileştirdiğini göstermiştir. Sprague Dawley cinsi erkek sıçanlar kullanılarak yapılan in vivo oral biyoyararlanım çalışmalarından elde edilen farmakokinetik parametreler, genel olarak nanokristal formülasyonlarda oral biyoyararlanımın belirgin ölçüde artması ile birlikte ilacın jet öğütme ile elde edilen mikrokristal formülasyonuna kıyasla optimize nanokristal formülasyonunda oral biyoyararlanımın yaklaşık 7,1 kat arttığını göstermiştir.	80
	Efonidipin (%4, a/h)	Islak Öğütme	SLS (%0,04, a/h), Poloksamer 188 (%0,4, a/h)	20-100	108,6 ± 5,2	%0,5 (a/h) oranında tween 80 içeren pH 6,5 fosfat tamponu ortamında (USP 39 Type II Apparatus - 100 rpm - 500 mL çözünme ortamı - 37°C ± 0,5°C) gerçekleştirilen in vitro çözünme çalışmaları organik çözücü ile katı dispersiyon tekniğine göre hazırlanmış piyasa preparatı (Landel® tablet) ve nanokristal formülasyonunun çözünme profilinin etkin maddenin çözünme profilinden daha iyi olduğunu ve f2 benzerlik hesabına göre; piyasa preparatı ve nanokristal formülasyonu arasında benzerlik olduğunu göstermiştir. Sprague Dawley cinsi erkek sıçanlar kullanılarak yapılan in vitro intestinal permeabilite çalışmaları, nanokristal formülasyonlarının etkin maddeye kıyasla daha yüksek permeabilite katsayılarına sahip olduğunu kanıtlamıştır. Oral uygulama sonrası elde edilen farmakokinetik parametreler, optimum formülasyonun ilacın oral biyoyararlanımını yaklaşık 2,2 kat artırdığını göstermiştir.	177

2.5.3. Nanokristallerin Kurutulması

Nanosüspansiyonlarda uzun süre fiziksel ve kimyasal stabilitenin korunması ve oral yolla kullanılacak ilaçların tablet ya da kapsül gibi katı ilaç formunda verilerek hasta uyuncunun artırılabilmesi amacıyla genellikle katı hal tercih edilmektedir (153). Bu amaçla daha çok püskürterek kurutma ve dondurarak kurutma (liyofilizasyon) gibi teknikler kullanılmaktadır (66, 163, 167). Fakat püskürterek ve dondurularak kurutulmuş tozlar zayıf toz özellikleri nedeniyle oral katı dozaj formları için doğrudan kullanılamazlar. Ayrıca bu teknikler zaman alıcı ve pahalı tekniklerdir. Bu sebeple literatürde sprey granülasyon ve pelletleme (bead layering; bilye tabakalama), nanosüspansiyonların kurutulmasında nispeten daha basit ve ekonomik alternatif kurutma yaklaşımları olarak önerilmiştir. Fakat bu yöntemler her ne kadar nanosüspansiyonları kurutmak için kullanılabilse de, bugüne kadar bu iki tekniği incelemiş ve karşılaştırmış çok fazla çalışma bulunmamaktadır (167).

Kurutma işleminde yöntem koşullarının doğru tasarlanmaması, sistemde güçlü agregatların oluşması ve sistemin tekrar disperse edilememesi gibi sorunlara neden olabilmektedir. Bu durum dispersiyon halinde sistemdeki kristal yapıların yüzey enerjisi kullanılan stabilizanlar ile kontrol edilirken sistemin kurutulması sonrasında stabilizan sistemlerinin de katı hale geçmesi nedeniyle partiküllerin etrafındaki koruyucu etkilerinin azalmasına bağlanmaktadır (178). Bu yüzden nanosüspansiyonun kurutulması sonuç ürünü etkileyen kritik bir işlemdir ve uygun yöntemin seçilmesi çok önemlidir.

Püskürterek kurutma tekniğinde çeşitli kurutma kazanlarında püskürtülen nanosüspansiyonun sıcaklığın etkisi ile küresel partiküller halinde kuruması sağlanmaktadır. Burada püskürtülecek dispersiyonun derişimi, vizkozitesi, sıcaklık ve püskürtme hızı kurutma prosesini etkileyen özellikler olmakla birlikte bu teknik, sıcaklıktan etkilenen etkin maddeler için uygun bir yöntem değildir (167, 179, 180). Patel ve ark. (66) ıslak öğütme tekniğine göre hazırlamış oldukları nifedipin nanosüspansiyonunun stabilitesini artırmak için matriks oluşturması amacıyla %5 (a/h) oranında mannitol kullanarak (Püskürterek kurutma koşulları; giriş sıcaklığı:

125°C, çıkış sıcaklığı: 60°C ve akış hızı: 2 mL/dak.) püskürterek kurutma tekniğine göre kurutmuştur. Liyofilizasyon sonrası optimum nanokristal formülasyonun partikül boyutunun 302 nm'den 349 nm'ye çıktığı bildirilmiştir. Partikül boyutundaki artışın nedeni, formülasyonda bulunan mannitolün varlığından ötürü kabuk oluşum teoremi (*shell formation phenomena*) ile açıklanmıştır. Partikül boyutu artmış olmasına karşılık daha stabil bir sistemin hazırlandığı bildirilmiştir (66). Yapılan bir başka çalışmada, Ouan ve ark. (74) kombine bir yöntem kullanarak (çöktürme ve yüksek basınçlı homojenizasyon) nitrendipin nanokristalleri hazırlamış ve nanosüspansiyonu taşıyıcı olarak laktoz ve mannitolün farklı oranlarını kullanarak püskürterek kurutma tekniğine göre kurutmuştur. Mannitol konsantrasyonunun daha yüksek olduğu (%1,7, a/h) formülasyonlarda daha düşük kullanıldığı (%0,7, a/h) formülasyonlara kıyasla liyofilizasyon sonrası partikül boyutunda daha az bir artış gözlenirken her iki taşıyıcı aynı oranda kullanıldıklarında (%0,3), laktoz ile hazırlanan formülasyonlarda liyofilizasyon sonrası partikül boyutunda daha fazla bir artış gözlenmiştir. Bu çalışma, püskürterek kurutma tekniğinde kullanılacak taşıyıcı sistemin türü ve miktarının kurutma prosesi sonrası elde edilen sonuç ürünün partikül boyutunu önemli ölçüde etkileyebileceğini göstermiştir (74).

Dondurarak kurutma tekniğinde ani bir dondurma işleminin ardından primer ve sekonder kurutma işlemleri gerçekleştirilmektedir. Bu teknik kompleks ve pahalı bir teknik olmasına rağmen, nanosüspansiyonlar ve düşük konsantrasyonda etkin madde içeren sistemler için diğer yöntemlere kıyasla daha çok tercih edilmektedir. Ayrıca dondurarak kurutma işleminde kurutma prosesi öncesinde formülasyona sükröz, laktoz, trehaloz, maltoz, dekstran ve mannitol gibi suda çözünen şekerler gibi çeşitli kriyoprotektanlar ilave edilmektedir. Kriyoprotektanlar donmamış sıvı fazın oluşumunu, donmuş ve donmamış fazın ayrışması ve sistemde agregatların meydana gelmesini engellemektedir (153, 178). Dondurarak kurutma tekniğinde kullanılan kriyoprotektanın türü ve miktarı oldukça önemli olmakla birlikte bu amaçla en sık kullanılan madde mannitoldür (181). Li ve ark. (176) yapmış oldukları bir çalışmada, nimodipin nanokristallerini hazırlamış ve farklı kriyoprotektan türü, oranı ve kombinasyonları (mannitol, sorbitol, trehaloz ve maltoz) ile elde edilen tozların çeşitli karakteristik özelliklerini incelemiştir. Bu

çalışmada sorbitol kullanılarak kurutulan formülasyonların güç redisperse edilebilirken diğer kriyoprotektanlar ile kurutulan formülasyonların kolay bir şekilde redisperse edildiği gösterilmiştir. Sadece mannitolün kullanıldığı formülasyonlarda ise, partikül boyutunda ciddi bir artış olduğu bildirilmiştir. Diğer kriyoprotektanlar ile partikül boyutu istenilen seviyelerde korunabilmesine rağmen, elde edilen tozun hacimli olması nedeniyle farklı kriyoprotektan kombinasyonları da incelenmiş ve optimum koşullar %2 (a/h) maltoz ve %2 (a/h) mannitol kombinasyonu ile elde edilmiştir. Ayrıca stabilite çalışmaları, nimodipin nanosüspansiyonunun 15 gün boyunca stabil olduğunu, bunun yanı sıra liyofilizasyon tekniği ile hazırlanan optimum nanokristal formülasyonun hem akıcılığının iyi olduğunu hem de en az 24 ay boyunca stabil olduğunu göstermiştir (176). Bazen liyofilizasyon sonrası sonuç ürünün partikül boyutunda artış gözlenirken, bazen uygun kurutma yöntemi ile sonuç ürünün partikül boyutunun istenilen düzeyde korunması sağlanabilir, hatta partikül boyutunda bir azalma bile gözlenebilir. Fu ve ark. (175) yapmış oldukları bir çalışmada, mikroçöktürme ve yüksek basınçlı homojenizasyon tekniğini kullanarak nimodipin nanokristallerini (Nano-1, Nano-2 ve Nano-3) hazırlamıştır. Hazırlanan nanokristal formülasyonları, kriyoprotektan olarak %5 maltoz ve %5 mannitol kullanılarak dondurarak kurutma tekniğine göre kurutulmuştur. Liyofilizasyon sonrası Nano-1 formülasyonunun partikül boyutunun arttığı saptanırken, Nano-2 ve Nano-3 formülasyonlarında partikül boyutunun azaldığı görülmüştür ve bu durum genel olarak kullanılan liyofilizasyon tekniğinin yeniden dağılan partiküllerin boyutunu etkilemediği şeklinde yorumlanmıştır (175).

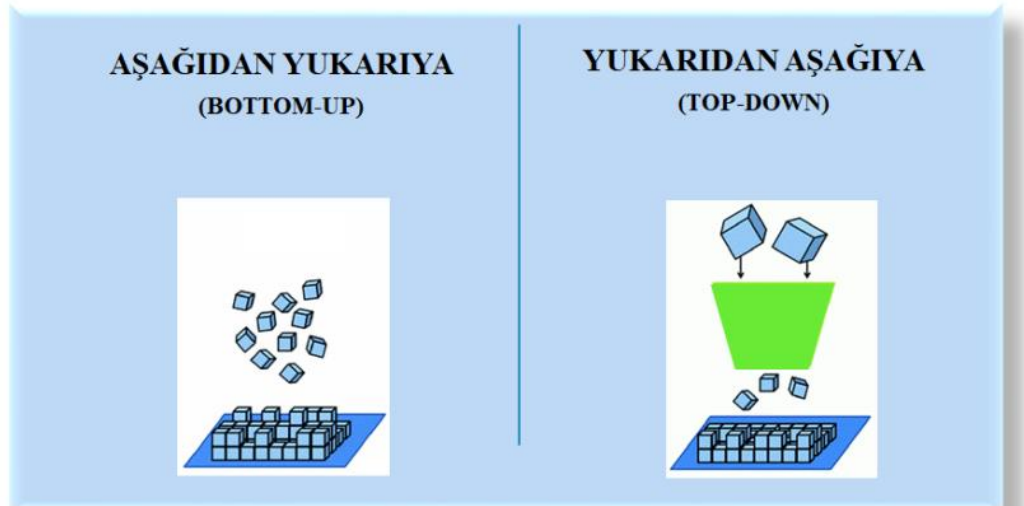
Sprey granülasyon, nanosüspansiyonun mikrokristalin selüloz, mannitol gibi etkisiz bir taşıyıcı üzerine püskürtülmesiyle granüllerin oluşturulması tekniğidir. Pelletleme ise, nanosüspansiyonun bir ya da daha fazla film oluşturucu polimer ile inert bilyeler (şeker, mikrokristalin selüloz) üzerine kaplanması tekniğidir (167). Meruva ve ark. (167) yapmış oldukları bir çalışmada, ıslak öğütme tekniğine göre hazırlamış oldukları irbesartan nanokristallerinin stabilitesini ve elde edilen toz karışımının akıcılığını sprej granülasyonu ve pelletleme yöntemlerini kullanarak iyileştirmeyi hedeflemiştir. Sprej granülasyon tekniğinde bağlayıcı çözeltisi olarak kullanılan HPMC E3 çözeltisi (%0,5, a/a) hazırlanan nanokristal dispersiyonuna

ilave edilmiş ve karıştırılarak granülasyon dispersiyonu hazırlanmıştır. Daha sonra bu dispersiyon ön denemeler sonrası optimize edilen yöntem koşullarında bir akışkan yatak içerisindeki mikrokristalin selüloz (*Avicel[®] pH 200*) ve mannitol (*Pearlitol[®] 200*) üzerine püskürtülerek nanokristal formülasyonunun kuruması sağlanmıştır. Sprey granülasyon işlemi sonrası tozun X-ışını kırınımı (*Powder X-ray diffraction (PXRD)*) ve diferansiyel taramalı kalorimetre (*Differential scanning calorimetry (DSC)*) analizleri herhangi bir polimorfik dönüşümün olmadığını ve kristal yapının korunduğunu gösterirken ilaç yükleme etkinliği %94-100 arasında bulunmuş ve kurutma ile kayıp %1'den düşük olarak saptanmıştır. Ayrıca sprey granülasyon için kullanılan taşıyıcının ilacın çözünme profilini etkilediği ve irbesartan nanokristalleri içeren mannitol granüllerinin, mikrokristalin selüloz granüllerine kıyasla daha hızlı bir çözünme gösterdiği bildirilmiştir. Bu durum bir şeker alkolü olan mannitolün suda yüksek oranda çözünmesi ve bunun yanı sıra mikrokristalin selülozun suda şişebilir özelliğe sahip olması ile ilişkilendirilmiştir. Pelletleme yönteminde de bağlayıcı çözeltisi olarak HPMC E3 çözeltisi (%0,5, a/a) kullanılmıştır ve irbesartan nanosüspansiyonu ile hazırlanan kaplama dispersiyonu bir akışkan yatak kullanılarak 200 µm boyutundaki mikrokristalin selüloz tanecikleri üzerine kaplanmıştır. İşlem sonrası PXRD ve DSC analizleri ile polimorfik dönüşümün olup olmadığını araştırılmıştır. PXRD analizi kristal yapının korunduğunu gösterirken, DSC analizinde irbesartanın erime sıcaklığından daha düşük bir sıcaklığa doğru hafif bir kayma gözlenmiştir. Bu durum küçük partikül boyutuna sahip nanokristaller ve irbesartan yüzeyinde bulunabilecek stabilizan varlığı ile açıklanmıştır. Bu teknik ile elde edilen ilaç yükleme etkinliğinin %98-110 arasında olduğu bulunmuş ve kurutma ile kayıp %1'den düşük olarak saptanmıştır. Ayrıca kurutulan nanokristal formülasyonun, irbesartan nanosüspansiyonuna kıyasla daha yavaş bir çözünme profili gösterdiği saptanmış ve bu durum kaplı nanokristallerin daha yavaş ıslanması ve parçalanması ile ilişkilendirilmiştir (167). Meruva ve ark. yapmış oldukları bir diğer çalışmada hazırladıkları irbesartan nanokristallerini sprey granülasyon ve pelletleme teknikleri ile kuru toz haline getirip ilacın mini-tabletlerini geliştirmiştir. Elde edilen sonuçlar, sprey granülasyonunun irbesartan nanosüspansiyonunun kurutulması ve mini

tabletinin hazırlanması için pelletleme tekniğine kıyasla daha üstün bir kurutma yaklaşımı olduğunu göstermiştir (182).

2.5.4. Nanokristal Hazırlama Teknolojileri

Nanokristal formülasyonlarının hazırlanmasında temelde aşağıdan yukarıya (*bottom-up*) ve yukarıdan aşağıya (*top-down*) olmak üzere iki yöntem kullanılmaktadır. Ayrıca son yıllarda bu tekniklerin birlikte kullanıldığı kombine yöntemler de sıklıkla tercih edilmektedir. Şekil 2.3.'de gösterildiği gibi yukarıdan aşağıya yöntemler büyük partiküllerin çeşitli tekniklerle daha küçük partiküllere dönüştürülmesini kapsarken, aşağıdan yukarıya yöntemler basitçe bir çözücü içerisinde çözülmüş ilaç moleküllerinin çöktürülmesini kapsamaktadır (98, 151, 153).



Şekil 2.3. Nanokristal hazırlama teknolojileri.

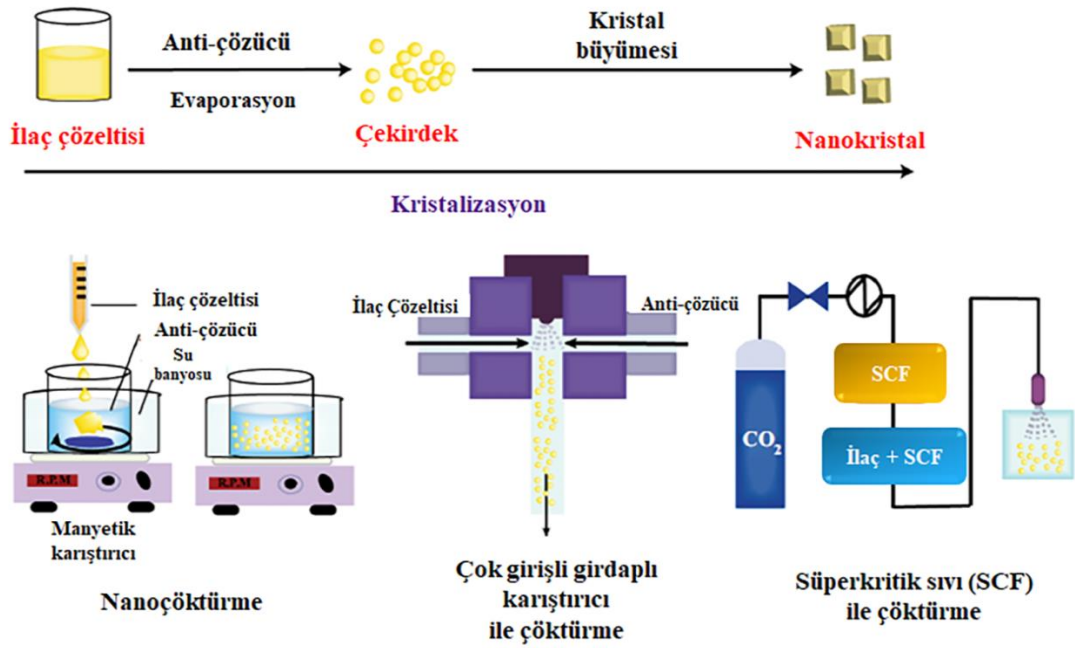
Aşağıdan Yukarıya (*Bottom-Up*) Teknolojisi

İlk kez 1988 yılında List ve Sucker tarafından *Hydrosol*[®] hazırlanmasında kullanılan bu teknolojiye, sıvı çözücü-antiçözücü eklenmesi ile çöktürme, çözücü uzaklaştırılması ile çöktürme, yüksek enerji yöntemi ile çöktürme ve süperkritik sıvı varlığında çöktürme gibi çeşitli çöktürme teknolojileri kullanılmaktadır (101, 183). Bu tekniğin, daha düşük enerji ve daha basit ekipman gerektirmesi, istenilen

partikül boyutunun en iyi şekilde kontrolünün sağlanabilmesi ve ilaç partiküllerinin iyi disperse edilebilmesine olanak sağlaması gibi üstünlükleri bulunmaktadır (101, 184-186). Bunlara ek olarak düşük sıcaklıklarda çalışılabilir olması bu yöntemi ısıya duyarlı etkin maddeler için tercih edilebilir hale getirmektedir. Fakat aşağıdan yukarıya yöntemler organik çözücü artığının bulunabilmesi, stabilize edilme gereklilikleri (partiküller büyüme eğiliminde olduğu için) ve her ilaca uygulanamaması (ilacın en az bir çözücü içinde çözünmesi gerekmektedir) gibi dezavantajlarından dolayı genellikle ölçek büyütme çalışmaları için uygun değildir (98, 184-186). İlaç endüstrisinde henüz bu teknoloji ile geliştirilmiş bir ürün bulunmamaktadır.

Çöktürme teknolojileri arasında en çok tercih edilen yöntem, daha basit olması sebebiyle sıvı çözücü-antiçözücü eklenmesi ile çöktürmedir. Sıvı çözücü-antiçözücü eklenmesi ile çöktürme işleminde; etkin madde uygun bir çözücüde (solvent) çözündürülür. Daha sonra, çözücü ortam ile karışabilen fakat etkin maddenin çözünmediği bir antiçözücü (anti-solvent) çözücü faza eklenir ve ilaç partikülleri nanokristaller halinde çökerler. Bu yöntemde nanokristallerin oluşumu nükleasyon ve kristal büyümesi olmak üzere iki temel basamağa bağlı olarak gerçekleşmektedir (101, 183). Aşağıdan yukarıya teknolojileri Şekil 2.4.'de özetlenmiştir. Bu teknolojiye kullanılan ilaç konsantrasyonu, seçilen stabilizan sistemi, ilaç/stabilizan oranı, çözücü ve antiçözücü hacmi, karıştırma hızı, sonikasyon süresi ve şiddeti ve çöktürme sıcaklığı sonuç ürünü etkileyen genel formülasyon parametreleridir (101). Ayrıca çözücü/antiçözücü oranının hazırlanan sistemde partikül boyutunu etkileyen önemli faktörlerden biri olduğu bilinmektedir (63). Jain ve ark. (63) çözücü-antiçözücü çöktürme yöntemine göre kandesartan sileksetil nanokristallerini hazırlayarak ilacın düşük çözünürlük sebebi ile sınırlı olan oral biyoyararlanımını artırmayı hedeflemiştir. Bu amaçla ön çalışmalar sırasında çeşitli formülasyon ve yöntem parametreleri değerlendirilmiş ve optimum formülasyon üzerinde in vivo çalışmalar yapılarak oral biyoyararlanımın nasıl etkilendiği değerlendirilmiştir. Ön çalışmalar sırasında farklı stabilizan konsantrasyonları (%0,1-0,25-0,5-1-2), stabilizan kombinasyonu oranı (25:75, 50:50, 75:25, a/a), çözücü/antiçözücü oranı (0,5:10, 1:10, 2:10), çöktürme sıcaklığı (4°C - 25°C), karıştırma hızı (600, 1200, 1800 rpm) ve ilaç çözeltisinin antiçözücü

içerisine ilave edilme hızı (2-6-10 mL/dak.) gibi parametreler incelenmiştir. Optimum formülasyon; %0,5 stabilizan konsantrasyonu, 50:50 (a/a) stabilizan oranı, 1:10 çözücü-antiçözücü oranı, 4°C çöktürme sıcaklığı, 1200 rpm karıştırma hızı ve 1 mL/dak. ilave edilme hızı koşullarında elde edilmiştir. Genel olarak çöktürme sıcaklığı ve ilacı ilave etme hızı arttıkça ve stabilizan konsantrasyonu azaldıkça, partikül boyutu artmıştır (63).



Şekil 2.4. Aşağıdan yukarıya (Bottom-up) teknolojilerinin şematik gösterimi (159).

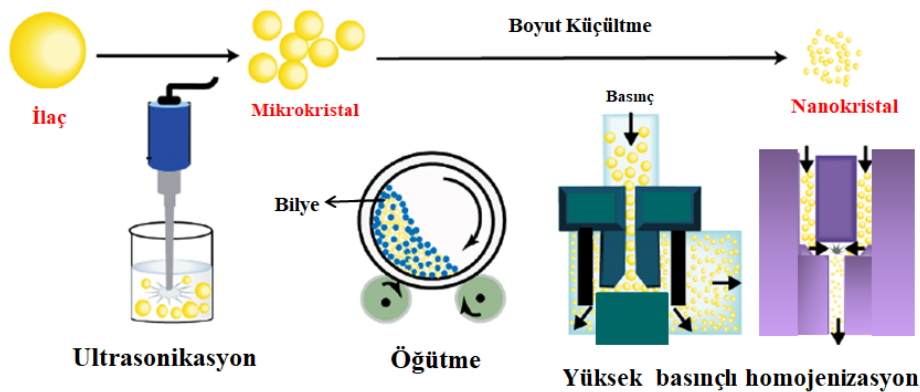
Çözücü uzaklaştırılması ile çöktürme işleminde; temelde dondurarak ve püskürterek kurutma teknikleri kullanılmaktadır. Bu teknikler tek başına genellikle nano boyuta inmek için yeterli olmadığı için her iki yöntem içinde sıvı atomizasyon tekniği (*liquid atomization technique*) gerekmektedir (101). Fakat sıvı atomizasyon tekniklerinde organik fazın hızlı uzaklaştırılması nedeniyle sistemde stabilite problemi yaratabilecek amorf yapılar oluşabilmektedir (187). Yüksek enerji yöntemi ile çöktürme işleminde; çöktürme tekniği, yüksek basınçlı homojenizasyon, ultrasonik dalga ve yüksek enerjili karıştırma gibi yüksek enerji içeren bir yöntem ile birlikte kullanılmaktadır (101). Çünkü çöktürme işlemi tek

başına bazen partikül boyutunun nano boyuta düşürülmesi için yeterli olmamaktadır. Bu yüzden çöktürme işleminin ardından genellikle sonikasyon işleminin uygulandığı kombine yöntemler tercih edilmektedir. Ayrıca çöktürme işlemi sonrasında elde edilen partiküller genellikle amorf yapıdadır ve bu yapıların çözünürlükleri daha yüksek olmasına rağmen daha kararsızdırlar. Bu kararsızlık kendini kristal büyümesi (Oswald olgunlaşması) şeklinde göstermektedir. Bu yüzden ultrasonikasyon gibi ekstra bir enerji uygulanarak hem partikül boyutu azaltılmakta hem de yapının kararlı kristal hale dönüşümü sağlanmaktadır (71). Kaseem ve ark. (174) yapmış oldukları bir çalışmada, çözücü-antiçözücü sonopresipitasyon (çöktürme ve ultrasonikasyon yöntemlerinin kombinasyonu) tekniğine göre lasidipin nanokristallerini hazırlayarak oldukça lipofilik karakterde olan bu etkin maddenin doyumluk çözünürlüğü ve çözünme profilini iyileştirmeyi amaçlamıştır. İlaç:stabilizan oranı, sürfaktan yüzdesi ve sonikasyon süresi gibi formülasyon ve yöntemle ait parametreleri optimize edebilmek için Box-Behnken tasarımı ile yapılan çalışmalar sonucunda, optimum koşullar sırasıyla; 1, %100 ve 6,5 dak. olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan istatistiksel model, tüm parametrelerin oluşan nanokristallerin partikül boyutu ve polidispersite indeksi (PDI) değerlerini değiştirdiğini bunun yanı sıra sadece stabilizan yüzdesinin zeta potansiyel değerlerini etkilediğini göstermiştir (174). Başka bir çalışmada ise, Xia ve ark. (71). çöktürme-ultrasonikasyon yöntemine göre nitrendipin nanokristallerini hazırlamış ve etkin madde (20, 30, 40, 60, 100 mg/mL) ve stabilizan konsantrasyonu (%0,1-0,15-0,25-0,5-1-1,5, a/h), çöktürme sıcaklığı (3°C-35°C), sonikasyon süresi (5, 10, 15, 20 dak.) ve sonikasyon işleminde kullanılan gücün (200, 300, 400, 580 W) formülasyon optimizasyonu üzerine etkisini incelemiştir. Optimize formülasyon; 30 mg/mL ilaç konsantrasyonu, %0,15 stabilizan oranı, 15 dak. sonikasyon süresi, 3°C çöktürme sıcaklığı ve 400 W sonikasyon gücü koşullarında elde edilmiştir. Genel olarak çöktürme sıcaklığı arttıkça partikül boyutunun arttığı, sonikasyon süresi ve gücü arttıkça partikül boyutunun azaldığı saptanmıştır. 15 ve 20 dak.'lık ultrasonikasyon süreleri ve 400 W ve 580 W'luk sonikasyon güçleri sonunda elde edilen partikül boyutlarının yakın olması sebebiyle, 15 dak.'lık sonikasyon süresi ve 400 W'luk sonikasyon gücünün istenilen partikül boyutunun elde edilmesinde yeterli olacağı belirtilmiştir (71).

Süperkritik sıvı varlığında çöktürme işleminde; karbondioksit (CO₂), amonyak, etan, etilen ve kloroform gibi süperkritik çözücü içerisinde çözünen ilaç moleküllerinin süperkritik çözücünün genişmesi sonucu ilaç nanokristalleri şeklinde çökmesi ile elde edilmektedir. Bu süperkritik çözücülerin bazılarının toksisite ve yanıcılık sorunu bulunmaktadır. CO₂, ucuz ve kolay ulaşılabilir olması, toksik ve yanıcı olmaması nedeniyle en fazla kullanılan süperkritik çözücüdür (101). Uzun bir üretim prosesi içermesi ve pahalı bir yöntem olmasına rağmen bu yöntem ile nano boyutta partikül eldesi ve partikül boyutu dağılım aralığı dar sistemlerin hazırlanması mümkündür (186, 188).

Yukarıdan Aşağıya (Top-Down) Teknolojisi

Yukarıdan aşağıya teknolojisi ultrasonikasyon, öğütme ve yüksek basınçlı homojenizasyon gibi tekniklerle mikro boyuttaki partikülün boyutunun nano boyuta indirilmesi temeline dayanmaktadır. Yukarıdan aşağıya teknolojileri Şekil 2.5.'de özetlenmiştir. Ultrasonikasyon tekniğinde; ses dalgaları ile oluşan yüksek enerji sayesinde boyut küçültme işlemi yapılmaktadır. Bu teknikte sonikasyon süresi ve uygulanan sonikasyon gücü, sonuç ürünün partikül boyutu üzerinde etkili olan formülasyon parametreleridir. Ultrasonik prob kullanılarak yapılan kontrollü ve tekrarlanabilir ultrasonikasyon, yöntemin ölçek büyütme çalışmaları açısından uygun olduğunu göstermektedir. Fakat öğütme ve yüksek basınçlı homojenizasyon tekniklerine kıyasla daha basit ve kısa bir yöntem olmasına rağmen, sonikasyon sırasında sıcaklığın kontrol edilmesinin oldukça güç olması yöntemi ısıya duyarlı etkin maddeler için bu tekniğin kullanımını sınırlandırmaktadır (159).



Şekil 2.5. Yukarıdan aşağıya (Top-down) teknolojilerinin şematik gösterimi (159).

Öğütme tekniğinde; jet değirmenleri, kolloit değirmenler ve bilyeli değirmenler gibi çeşitli öğütücüler kullanılarak mekanik bir kuvvet yardımı ile boyut küçültme işlemi yapılmaktadır. Bilyeli değirmenler kullanılarak gerçekleştirilen ıslak öğütme (media milling), en çok tercih edilen öğütme tekniğidir. Literatürde yaş öğütme (wet milling), inci öğütme (pearl milling) ve boncukla öğütme (bead milling) gibi farklı isimlerle de yer almaktadır. Islak öğütme tekniğinde, ilaç dispersiyonu temel olarak etkin madde, stabilizan sistemi ve dispersiyon ortamından oluşmaktadır. İlaç dispersiyonunun boyutu, dönen bir öğütme kazanı içindeki bilyeler ile oluşturulan mekanik güç yardımıyla azaltılmaktadır. Bu teknikte; öğütme süresi, öğütme hızı, öğütmede kullanılan bilyelerin sayısı, büyüklüğü, yapılmış olduğu materyal (krom agat, zirkonyum oksit, porselen, cam, akik veya özel polimerler kullanılarak üretilmiş bilyeler), öğütme kazanında kapladığı hacim ve ortam sıcaklığı gibi parametreler sonuç ürün üzerinde etkili olan formülasyon parametreleridir. Öğütme süresinin nanokristal eldesine kadar sürmekle birlikte 30 dak.'dan birkaç güne kadar değişebilmekte olduğu, kullanılacak bilyelerin öğütme kazanı içerisinde kapladığı hacmin öğütme kazanının %30-50'si kadar olması gerektiği ve ıslak öğütme için kullanılan en yaygın bilye boyutlarının 0,1 mm ve 0,5 mm aralığında olduğu bildirilmiştir (99, 159, 167). Meruva ve ark. (167) yapmış oldukları bir çalışmada, ıslak öğütme tekniğine göre hazırladıkları irbesartan nanokristallerinin hazırlanması sırasında kullanılan öğütme hızı (100 rpm ve 250 rpm), öğütme süresi (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 saat), öğütme haznesine yerleştirilen bilyelerin büyüklüğü (0,1 mm ve 0,5 mm) ve hacmi (%20, 40, 50, a/h) gibi yöntem parametrelerinin sistemin ortalama partikül boyutu ve dağılımı üzerine etkisini incelemiştir. Her iki bilye boyutu için de yüksek hızda (250 rpm) öğütülen süspansiyonun renginde meydana gelen değişim, ilacın amorfizasyonunu ya da kimyasal bozunmaya uğrayabileceğini düşündürmüştür. Süspansiyon düşük hızla (100 rpm) öğütüldüğünde ise, 0,1 mm boyutundaki bilyeler kullanılarak hazırlanan formülasyonda elde edilen partikül büyüklüğü (3000 nm) sebebi tam olarak açıklanamamakla birlikte 0,5 mm boyutundaki bilyeler ile elde edilen partiküllerin boyutundan (442 nm) yaklaşık 7 kat büyük olarak tespit edilmiş ve tüm bu sonuçlar neticesinde optimum yöntem parametreleri 0,5 mm boyutundaki bilyeler ve 100 rpm öğütme hızı olarak belirlenmiştir. Öğütme

haznesindeki bilyelerin hacmi %20 den (750 nm) %40'a (442 nm) çıkarıldığında elde edilen kristallerin partikül boyutunda bir azalma gözlenirken, %50'ye çıkarıldığında meydana gelen renk değişikliği yüksek bilye miktarında artan çarpışma sıklığından dolayı irbesartanın kimyasal bozunmasına veya amorfizasyonuna bağlanmış ve optimum hacim %40 olarak belirlenmiştir. Ayrıca öğütme süresi arttıkça partikül boyutunun azaldığı ve 5, 6 ve 7 saat sonunda elde edilen boyutların birbirine yakın olması sonucu 5. saatin istenilen boyut için uygun bir zaman olduğu sonucuna varılmıştır (167).

Öğütme işlemi sırasında karşılaşılan ana sorunlar; bilyelerin aşınması sonucu sistemin kontamine olması ve ilacın öğütme haznesi ve bilyelerin üzerine yapışmasıdır. Ayrıca uzun süreli öğütme işlemlerinde mikrobiyal üreme gibi problemlerle de karşılaşılabilir. Yavaş ve uzun bir prosesi içermesi ve üretim hacminin öğütme haznesinin hacmi ile sınırlı olması bu yöntemi kısıtlayan genel faktörlerdir. Fakat çözünürlüğü 10 mg/mL'den düşük birçok ilaca uygulanabilir olması, organik çözücü kalıntısını engellemesi, elde edilen ilaç yükleme etkinliğinin yüksek olması, kristal yapının korunması ve birçok farklı dozaj şeklinin (tablet, kapsül, steril ürünler gibi) hazırlanmasına uygun olması gibi üstünlükler sayesinde günümüzde bu teknoloji kullanılarak hazırlanmış ve ticarileşen birçok ürün bulunmaktadır (153, 184, 185). Ayrıca antihipertansif tedavide kullanılmak üzere geliştirilen *Verelan PM® kapsül* ve *Herbesser® tablet* ıslak öğütme tekniği kullanılarak üretilmiştir (26, 161, 162).

Yüksek basınçlı homojenizasyon tekniğinde; ilacın bir stabilizan sistemi ile hazırlanan dispersiyonunun yüksek basınç (1000, 2000 bar) yardımıyla çeşitli homojenizatörlerden üst üste geçirilmesi ile boyut küçültme işlemi yapılmaktadır. Bu teknik kullanılan homojenizatörün türüne ve homojenizasyon prensibine göre mikroakışkan teknolojisi ve piston boşluk homojenizasyon olmak üzere iki sınıfta değerlendirilmiştir (151, 159, 184, 185, 189). İlk kez SkyePharma tarafından geliştirilen *Mikroakıştan teknolojisi (IDD-PTM, Insoluble Drug Delivery Particle Technology)* jet akış prensibine göre çalışmaktadır ve akış yönüne bağlı olarak Z veya Y tipi homojenizasyon hücrelerinin bulunduğu jet akış homojenizatörleri kullanılmaktadır. Çok sayıda döngü gerektirdiğinden büyük hacimdeki üretimler

için uygun olmaması ve geniş partikül büyüklüğü dağılım aralığına sahip sistemlerin oluşturulması bu yöntemin sakıncalarıdır (151, 185). Piston boşluklu homojenizasyon yönteminde ise; ilaç dispersiyonun sulu olup olmamasına göre farklı teknolojiler geliştirilmiştir. Sulu dispersiyonlarda nanokristal eldesi yöntemi (*DissoCubes*[®], SkyePharma), ilk kez Müller ve ark. tarafından 1995 yılında geliştirilmiştir ve kullanılan dispersiyon ortamı sudur (184). Fakat bu yöntemde sistemin tıkanmaması için ilaç partiküllerinin öncelikle öğütme ve sonikasyon işlemleri ile mikron boyutuna getirilmesi gerekmektedir. Suyu azaltılmış/susuz dispersiyonlarda nanokristal eldesi yönteminde (*Nanopure*[®], Pharmasol) ise, su ile karışabilen karışımlar (gliserol/su, etanol/su ve PEG/su gibi) kullanılmaktadır. Yüksek basınçlı homojenizasyon tekniklerinde elde edilen partiküllerin boyutu ve dağılım aralığı uygulanan homojenizasyon basıncı, döngü sayısı ve sıcaklığa bağlı olarak değişmektedir (151, 185). Li ve ark. (176) yapmış oldukları bir çalışmada, mikroçöktürme ve ardından yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi ile nimodipin nanokristallerini hazırlamıştır. Yüksek basınçlı homojenizasyon tekniğinde farklı döngü sayıları (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 ve 20) ve homojenizasyon basınçları (600, 800, 1000 ve 1200 bar) kullanılarak bu parametrelerin sonuç ürün üzerindeki etkisi incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar genel olarak homojenizasyon basıncı ve döngü sayısı arttıkça elde edilen partiküllerin boyutunun azaldığını göstermiştir. Bu nedenle optimum yöntem koşulları için homojenizasyon basıncı 1000 bar ve döngü sayısı 20 olarak seçilmiştir (176). Bunun yanı sıra, homojenizasyon basıncı ve devir sayısının artmasına bağlı olarak her zaman partikül boyutunda iyileşme gözlenmeyebilir. Bu durum formülasyonda kullanılan birçok parametreye bağlı olarak değişmektedir. Quan ve ark.'nın (74) yapmış olduğu bir çalışmada çöktürme ve ardından yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi kullanarak nitrendipin nanokristalleri hazırlanmış ve yöntem optimizasyonu için farklı homojenizasyon basınçları (500, 1000 ve 1400 bar) ve devir sayıları (5, 10, 20, 30 ve 40) incelenmiştir. Homojenizasyon basıncı arttıkça partikül boyutu artarken span değerlerindeki azalma 1000 bar'ın optimum koşullarda kullanılmak üzere seçilmesi ile sonuçlanmıştır. 5 devir ile elde edilen nanokristal formülasyonun span değerine kıyasla 10, 20, 30 ve 40 gibi devir sayılarında elde edilen span değerleri daha düşük bulunmuştur (74).

Kombine Yöntemler

Öğütme ve yüksek basınçlı homojenizasyon gibi yukarıdan aşağıya teknikler kullanılarak hazırlanan formülasyonlarda ilacın çözünürlük ve oral biyoyararlanımında daha yüksek bir artış elde edildiği bildirilmiştir (163). Fakat bu yöntemlerde karşılaşılan bazı sorunlar istenilen özellikte ve etkili formülasyonların hazırlanmasını sınırlandırmaktadır. Bu yüzden yaşanan sorunların en aza indirilebilmesi amacıyla son zamanlarda yukarıdan aşağıya yöntemlerin çeşitli aşağıdan yukarıya yöntemler ile birlikte kullanılması ile gerçekleştirilen kombine yöntemler önerilmiştir. Bu amaçla geliştirilmiş ve patentlenmiş ilk kombine yöntem, mikroçöktürme işleminin ardından yüksek basınçlı homojenizasyon tekniğinin uygulandığı *NanoedgeTM* yöntemidir. İkinci kuşak teknoloji olarak bilinen *SmartCrystal[®]* teknolojisi ise, birden fazla teknoloji yerine bir seri teknolojinin bir arada kullanılmasını kapsamaktadır. *SmartCrystal[®]* teknolojisi ile daha küçük nanokristaller ve fiziksel stabilitesi daha iyi sistemlerin elde edilebildiği bildirilmiştir (185). Ayrıca literatürde kombinasyon tekniği ile geliştirilen yöntemler farklı kodlama numaralarıyla belirtilmiştir. H69 kodlu yöntemde, çöktürme yönteminin ardından yüksek basınçlı homojenizasyon tekniği uygulanmakta ve sonrasında organik solvan uzaklaştırılmaktadır. H96 kodlu yöntemde, sıcaklığa duyarlı etkin maddeler için dondurularak kurutulan ilaç dispersiyonunun yüksek basınçlı homojenizasyon gibi bir yukarıdan aşağıya yöntemle partikül boyutu azaltılmaktadır. H42 kodlu yöntemde ise, püskürtülerek kurutma sonrasında yüksek basınçlı homojenizasyon tekniği kullanılarak nanokristal eldesi sağlanmaktadır (98, 159, 185).

NKT ile üretilerek piyasaya sürülen ilk ürün 2000 yılında FDA'dan onay almış olan *Rapamune[®]* tablettir. *Rapamune[®]* tablet böbrek transplantasyonu sonrası organ reddinin önlenmesinde kullanılan immünosupresan etkili bir ilaçtır. Şu an ilaç piyasasında NKT ile üretilmiş antihipertansif etkili iki ilaç etkin maddesine (verapamil ve diltiazem) ait ruhsatlı ürün bulunmaktadır. Fakat endikasyon olarak antihipertansiyon endikasyonu ile değil antiaritmik ve antianginal olarak ruhsatlandırılmışlardır. NKT ile üretilen diğer ruhsatlı ilaçlar Tablo 2.4.'de verilmiştir. Nanokristal formülasyonları oral, parenteral, pulmoner, transdermal ve

oftalmik olmak üzere birçok yolla uygulanabilmektedir. Ayrıca nanokristal formülasyonlarına yapılan çeşitli yüzey modifikasyonları ile aktif ve pasif hedeflendirme de yapılabilmektedir.

Tablo 2.4. NKT ile üretilmiş ruhsatlı ve faz çalışmaları aşamasında olan ilaçlar (26).

Jenerik	Endikasyon	Ticari İsim	Firma	Durum
Aprepitant	Antiemetik	Emend	Merck	Pazarda
Deksmetifenidat Hidroklorür	Antipsikotik	Focalin XR	Novartis	Pazarda
Diltiazem	Antianjinal	Herbesser	Mitsubishi Tanabe Pharma	Pazarda
Ensulzon ve Oktanoksat	Kırışıklık karşıtı	Renergie Microlift	Lancome	Pazarda
Fenofibrat	Hiperkolesterolemi	Tricor	Abbott	Pazarda
Fenofibrat	Hiperkolesterolemi	Triglide	Sciele Pharma Inc.	Pazarda
Fenofibrat	Hiperkolesterolemi	Tridlide	Skye Pharma	Pazarda
Griseofulvin	Antifungal	Gris-Peg	Novartis	Pazarda
Gümüş	Antimikrobiyal	SILCRYST	Nucryst Pharmaceuticals	Pazarda
Megestrol	Antianoreksik	Megace ES	Par Pharmaceutical Companies	Pazarda
Metifenidat Hidroklorür	Antipsikotik	Ritalin LA	Novartis	Pazarda
Morfin Sülfat	Analjezik	Avinza	King Pharm	Pazarda
Nabilon	Antiemetik	Cesamet	Lilly	Pazarda
Nabilon	Antiemetik	Cesamet	Lilly	Pazarda
Naproxen Sodyum	Antiinflamatuvar	Naprelan	Wyeth	Pazarda
NPI 32101	Antiinflamatuvar	Acticoat	Nucryst Pharmaceuticals	Pazarda
Paliperidon Palmitat	Antidepresan	Invenga Sustenna	Johnson & Johnson	Pazarda
Rapamisin	İmmünespresif	Rapamune	Wyeth	Pazarda
Teofilin	Bronkodilatör	Theodur	Mitsubishi Tanabe Pharma	Pazarda
Tizanidin Hidroklorür	Kas Gevşetici	Zanaflex	Acorda	Pazarda
Verapamil	Antiaritmik	Verelan PM	Schwarz Pharma	Pazarda
Gümüş ve Gümüş sülfadiazin	İkinci derece yanık	NCT02108535	University of Sorocaba	Faz 4
Titanyum dioksit	Güneş yanığı	NCT01552135	Oslo University Hospital	Faz 4
Gümüş	Antibakteriyel	NCT00659204	Madigan Army Medical Center	Faz 3
Paklitaksel	Antikanser	—	American Pharmaceutical Partners	Faz 3
Paklitaksel	Antiinflamatuvar	Paxceed	Angiotech	Faz 3
2-Metoksiestradiol	Over kanseri	Panzem NCD	EntreMed	Faz 2
Bevacizumab	Antikanser (Karsinoid Tümör)	Panzem NCD and Avastin	EntreMed	Faz 2
Estradiol ve Progesteron	Menopoz Sendromu	NCT02467673	University Potiguar and InBios International, Inc.	Faz 2
Fenofibrat	Uyku Apnesi	—	Solvay Pharmaceuticals	Faz 2
Guanilhidrazon	TNF- α inhibitörü	Semapimod	Cytokine Pharmasciences	Faz 2
Gümüş	Antibakteriyel	Nucryst	Nucryst Pharmaceuticals	Faz 2
Temozolomid	Antikanser	Panzem NCD	EntreMed	Faz 2
Timektasin	Antikanser	Theralux	Celmed	Faz 2
Timektasin	Antikanser	—	NewBiotics/Ilex oncology	Faz 1/2
Budesonid	Astım	—	Sheffield Pharmaceuticals	Faz 1
Busulfan	Antikanser	—	Supergen	Faz 1
İnsülin	Antidiyabeti	—	Self-developed	Faz 1
Kalsiyum Fosfat	Herpes için mukozal aşı adjuvanı	—	Self-developed	Faz 1

2.6. Kalsiyum Kanal Blokörleri ve Etki Mekanizmaları

Kalsiyum iyonları, damar düz kası membranının lipit tabakalarına gömülmüş kanal veya proteinlerin oluşturduğu porlardan pasif difüzyon ile geçmektedir. Kalsiyum iyonu geçişine izin veren bu kanallar, belli bir voltajda kanalın kalsiyuma karşı açılıp kapanmasını sağlamaktadır. Normalde hücre içi

kalsiyum iyonu konsantrasyonu (10^{-7} M), hücre dışı kalsiyum iyonu konsantrasyonundan (10^{-3} M) düşüktür. Elektriksel bir uyarı sonucunda voltaja bağımlı kalsiyum kanalları açılmakta ve hücre içine kalsiyum iyonu akışıyla hücre içi iyon konsantrasyonu artmaya başlamaktadır. Bu durum ayrıca hücre içi kalsiyum deposu olan sarkoplazmik retikulumdan da kalsiyum iyonlarının salıverilmesini harekete geçirmektedir. Sonuç olarak hücre içi kalsiyum iyonu konsantrasyonunun 10^{-6} M'a kadar yükselmesi ile kalp ve damar düz kasındaki filamentler kasılmakta ve kan basıncı yükselmektedir (8).

Aktive edilme mekanizmalarına göre kalsiyum kanalları, reseptöre ve voltaja duyarlı kalsiyum kanalları olarak iki gruba ayrılmaktadır. Reseptöre duyarlı kalsiyum kanalları kateşolaminlerle (adrenalin ve noradrenalin) aktive edilmekle birlikte farmakolojik olarak α -reseptör ve β -reseptör blokörleri tarafından inhibe edilmektedir. Voltaja duyarlı kalsiyum kanalları ise; iyon özellikleri, aktivasyon ve inaktivasyon kinetikleri ile ilaçlara ve toksinlere duyarlılıklarına göre farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır. Bu kanallar; L (uzun süreli), T (kısa süreli), N (sinirsel), P (Purkinje), Q (beyin nöronlarında bulunan) ve R (rezidüel) gibi çeşitli alt tiplerden oluşmaktadır. Bunlardan N, P, Q ve R tipi kanallar çoğunlukla sinir sisteminde yer almaktadır. L-tipi kalsiyum kanalları, özellikle kalp kası ve damar düz kaslarında genişçe yayılmakla birlikte bu kanallardan kalsiyum girişi kas kasılmasının başlamasında anahtar bir olay olarak görülmektedir. L-tipi kalsiyum kanalları DHP'lere duyarlı kanallar olarak adlandırılmaktadır. T-tipi kalsiyum kanalları ise, kardiyak sinus nodu ile afferent ve efferent arteriyollerde yer alan düşük voltajla aktive edilebilen kanallardır (190-193). Ayrıca bu kanallar anjiyotensin II ve potasyumla indüklenen aldosteron sekresyonunda da rol almaktadır (193).

KKB, HT ve angina pekoris, periferik vasküler bozukluklar ve bazı aritmiler gibi çeşitli kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir ilaç grubudur. Bu ilaçlar, voltaj-bağımlı kalsiyum kanallarına (çoğunlukla L-tipi kalsiyum kanallarına) veya reseptörlere yüksek afinite ile bağlanarak hücre içine kalsiyum iyonu girişini azaltmakta, özellikle arteriyollerde düz kasları gevşeterek kan basıncını düşürmektedir.

KKB, günümüzde farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır. Kimyasal yapı özelliklerine göre; DHP, Fenilalkilamin (verapamil, gallopamil, bepridil, fendilin) ve Benzodiazepin (diltiazem) türevleri olarak adlandırılırken daha geniş çerçevede DHP yapısı taşıyanlar (DHP türevleri) ve DHP yapısı taşımayanlar (non-DHP türevleri; fenilalkilamin ve benzodiazepin türevleri) olarak da sınıflandırılmaktadır (11, 12). DHP türevlerinin, non-DHP türevlerine kıyasla çok daha güçlü vazodilatör etkiye sahipken non-DHP türevlerinin ise daha belirgin negatif inotrop etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Doku selektivitesi, etki süresi ve uygulama sıklığı gibi farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerine göre KKB, son zamanlarda “jenerasyon” olarak gruplandırılmıştır. Yeni jenerasyon KKB, yakın zamanda (temel yapı üzerinde yapılan çeşitli modifikasyonlar ile) geliştirilmiş, daha lipofilik yapıdaki DHP türevleridir ve günümüzde klinik olarak etkili dört farklı jenerasyonda DHP türevi KKB tanımlanmıştır. Bu ilaçlar, grubun prototipi olan nifedipine kıyasla daha yüksek vasküler seçiciliğe, daha yavaş başlayan ve daha uzun süren hipotansif etkiye ve daha düşük yan etki profiline sahip olmaları sayesinde HT’un tedavisinde oldukça etkilidir (193).

Birinci jenerasyonda yer alan nifedipin ve nikardipinin HT’a karşı kanıtlanmış etkileri olmasına rağmen hipotansif etkilerinin çok hızlı gelişmesi, kısa yarı ömürlü olmaları ve tedavi sırasında baroreseptör aktivasyonu ve sempatik aktivite ile ilgili bazı yan etkilerin gelişmesi nedeniyle klinik olarak kullanımlarında kısıtlamaya gidilmiştir (194). İkinci jenerasyon DHP’ler; yavaş salıveren nifedipin, felodipin ve nikardipin ile yeni DHP’ler olan benidipin, efonidipin, manidipin, nilvadipin ve nitrendipindir. Bu ilaçlarla hipotansif etkinin daha yavaş başlamasının yanı sıra daha az baroreseptör aktivasyonu ve daha düşük refleks taşikardi gibi üstünlükler elde edilmiştir. Üçüncü jenerasyon DHP’ler; amlodipin, barnidipin ve azelnidipin olup diğer ilaçlara kıyasla kimyasal olarak daha lipofilik bir yapıdadırlar. Bu ilaçlar, daha uzun hipotansif etkilerine ek olarak daha stabil bir farmakokinetik sergilemektedir ve kalp ya da böbrek yetmezliği olan hastalarda daha az kardiyoselektif olmaları nedeniyle daha iyi tolere edilebilmektedir. Dördüncü jenerasyon DHP’ler ise; cilnidipin ve lerkanidipin (L/N tipi KKB) olup bu ilaçlar da daha lipofilik yapıdadır ve daha uzun süreli bir hipotansif etkiye sahiptir. Özellikle miyokard iskemisi ve konjestif kalp yetmezliği

olan hasta gruplarında sempatik aktivasyon ve refleks taşikardiyi indüklemediklerinden ve negatif inotropik etkileri olmadığından daha geniş bir terapötik spektrum sunmaktadırlar (193).

2.6.1. 1,4-Dihidropiridin Türevleri

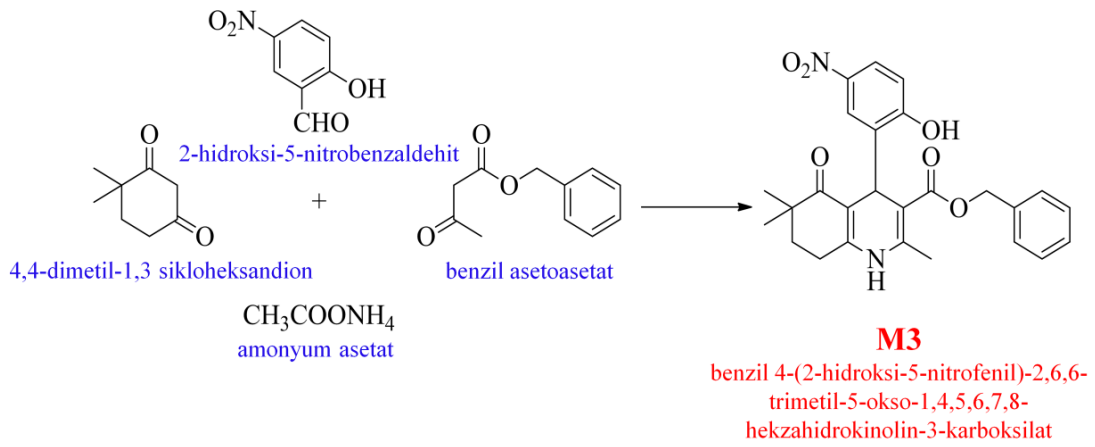
DHP, piridin halkasının kısmi redüksiyonuyla oluşan bir halka sistemidir ve kimyasal olarak teorikte beş izomerik DHP türevinin oluşumu söz konusudur. Bu izomerlerden, en kararlı olanları “1,2-Dihidropiridin” ve “1,4-Dihidropiridin” izomerleridir (195). 1,4-DHP’lerin ilk kez sentezleri Hantzsch tarafından 1882 yılında gerçekleştirilmiştir. Bu grubun prototipi olan nifedipin, 1975 yılında “Adalat®” ticari adıyla Bayer firması tarafından Almanya’da tedaviye sunulmuştur (8, 13). Klinikte nifedipin kullanımı ile başarılı sonuçların elde edilmesi, toksisitenin azaltılması ve daha uzun etki süreli yeni kuşak türevlerin sentezlenmesi için DHP türevleri üzerinde daha yoğun çalışmaların yapılmasını sağlamıştır (15, 16). DHP yapısı üzerinde yapılan çeşitli modifikasyonlar sonucu DHP halkasının kondanse sistem içerisine alındığı “hekzahidrokinolin” türevlerinin farklı tip kalsiyum kanalları üzerine etkili oldukları gösterilmiştir (18). Amlodipin, isradipin ve nifedipin gibi ticari DHP’ler, farmakolojik etkilerini göstermek için öncelikle L-tipi kalsiyum kanallarını hedeflemektedir (17). Temel yapı üzerindeki modifikasyonlarla sentezlenen yeni jenerasyon DHP’lerin N-tipi kalsiyum kanalları ve T-tipi kalsiyum kanallarına bağlandığı bildirilmiştir. N-tipi kalsiyum kanalları glomerüler basıncın kontrolünde ve T-tipi kalsiyum kanalları ise anjiyotensin II ve potasyum ile indüklenen aldosteron sekresyonunda önemli bir rol almaktadır. L-tipi kalsiyum kanalı blokajının yanı sıra bu iki tip kanalın blokajı, glomerüler kapiller basıncın azalmasını, renin-anjiyotensin-aldosteron sistemi ve sempatik sinir sisteminin stabilizasyonunu sağlamaktadır. Bu sayede her üç kanalı da bloke eden benidipin ve efonidipin gibi DHP türevleri, renal protektif etkileriyle tuza duyarlı HT olgularında üstünlük sunan diüretik etkiye sahip olmaktadır. Sonuç olarak bu ilaçlar, anjiyotensin II reseptör blokörleri ve anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleriyle birlikte hipertansiyonun kombine tedavisinde oldukça faydalı bir alternatif sunmaktadır (193).

Yeni jenerasyon DHP'ler, etki mekanizmaları açısından son zamanlarda oldukça yenilikçi ve faydalı bir tedavi seçeneği sunmasına rağmen, hala klinikte kullanımlarını kısıtlayacak sorunlara sahiptir. DHP'lerin gün ışığında hızla fotodegradasyonu sonucunda “*nitrozopiridin*” türevlerine dönüştüğü bildirilmiştir. Oksijenli ve oksijensiz koşullarda yapılan fotostabilite çalışmaları, oksijenin fotodegradasyon hızını artırdığını ve oluşan yıkım ürünlerinin farmakolojik etkide azalmaya neden olmasının yanı sıra hücrede toksik etkilere neden olabileceğini kanıtlamıştır (21). Bu ilaçların, biyolojik ortamda etkin bir şekilde kullanımını kısıtlayan bir diğer sorun ise, suda zayıf çözünürlükleri nedeniyle yaşadıkları düşük biyoyararlanım problemidir. Bu sorunların rasyonel bir çözümü için bazı araştırmacılar molekül üzerinde fotodegradasyondan sorumlu yapıların modifikasyonunu önerirken, bazı araştırmacılar kimyasal yapı modifikasyonuna ek olarak fiziksel ve kimyasal dayanıklılıklarını arttırmak için uygun bir formülasyon yaklaşımını önermektedir (22).

2.7. M3'ün Sentezi ve M3'e Ait Bilgiler

1,4-DHP halkası taşıyan KKB bileşik geliştirme çalışmaları sonucunda, DHP yapısını *hekzahidrokinolin* halka sistemi içinde taşıyan ve hem L- hem de T-tipi kalsiyum kanallarını etkili bir şekilde bloke eden “M3” (benzil 4- (2-hidroksi - 5-nitrofenil)- 2,6,6-trimetil - 5-okso - 1,4,5,6,7,8-hekzahidrokinolin - 3-karboksilat) bileşiğine ulaşılmıştır (18). Tez kapsamında bu ilaç adayı molekül ile ilgili çalışmalar yapılmıştır.

M3, modifiye Hantzsch sentezine göre, 4,4-dimetil-1,3-sikloheksandion, 2-hidroksi-5-nitrobenzaldehit, benzil asetoasetat ve amonyum asetatın etanol içindeki reaksiyonuyla Şekil 2.6.'da özetlendiği gibi elde edilmiştir. Karışım mikrodalga ışınması kullanılarak ısıtılmış (microwave-assisted one-pot method), soğutulmasını takiben çöken katı süzülerek, etanolla yıkanmıştır. Daha sonra, elde edilen katı etanol-su karışımından kristallendirilerek M3 saf olarak elde edilmiştir (18).



Şekil 2.6. M3'ün sentezi.

M3, sarı renkte, kristalize, higroskopik bir tozdur ve pratikte suda çözünmemektedir. Kapalı formülü “C₂₆H₂₆N₂O₆” olup molekül ağırlığı 462 g/mol'dür. Erime noktası; 185-187°C olarak bildirilmiştir (18).

M3'ün kalsiyum kanallarını bloke etme oranı (yapı aktivite çalışmaları) “*patch-clamp (yama-menteşe)*” yöntemine göre test edilmiş ve molekülün, hem L-hem de T-tipi kanallarda kalsiyum akımını etkili bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir.

Yama-menteşe yöntemi, voltaj kenetleme tekniğinin geliştirilmiş bir uygulaması olup, pipet içerisindeki elektrot yardımı ile hücrelerdeki voltaj değişikliklerinin ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntem, modern bir elektrofizyolojik teknik olup günümüzde hücre zarları ve hücre zarı kanallarından iyon akımlarını incelemek için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Özetle bu teknikte, özel olarak hazırlanmış mikroelektrotlar hücrelere temas ettirilerek hücre membran potansiyeli istenen değere kenetlenmekte ve membrandan geçen iyonik akım değişimi ya da akım kenetlenerek hücre membran potansiyel değişimi kayıt ve analiz edilmektedir (196).

2.8. Ağızda Dağılan Film Formülasyonları

İlk olarak nefes tazeleyiciler, diş bakım filmleri ve sabun filmleri olarak geliştirilen ADF formülasyonları etkin maddelerin oral uygulamalarına olanak sağlayan yeni bir teknolojidir. ADF'ler, temel olarak etkin madde ve çeşitli yardımcı maddelerden oluşan ve posta pullarına benzeyen ultra ince formülasyonlardır. Bu yüzden literatürde, ince şerit (*thin strip*), oral film (oral film), ağızda dağılan film (*orally dissolving film*), hızlı dağılan film (quick dissolve film), eriyen film (*melt-away film*), çözünür film (*soluble film*) ve gofret (*wafer*) gibi farklı isimlendirmelerle belirtilmişlerdir (197, 198). Literatürde her ne kadar farklı isimlendirmeler mevcutsa da EMA, ADF'lerin isimlendirmesi konusunda “ağızda dağılan film (*orodispersible film*)” ve FDA, “çözünür film (*soluble film*)” ifadelerinin kullanılmasını tercih etmiştir (199, 200). Avrupa Farmakopesi'ne (Euroen Pharmacopoeia; Ph. Eur.) göre; ADF'ler hızla dağılmak için ağız içi mukozaya yerleştirilen uygun materyallerin tek veya çok katmanlı tabakaları olarak tanımlanmış ve “*orodispersible film*” terimi ile ifade edilmiştir. Amerikan Farmakopesi (United States Pharmacopoeia; USP) ise, ADF'leri ağız boşluğuna yerleştirilen, etkin madde içeren ya da içermeyen bir ya da daha fazla katmandan oluşan ince tabakalar olarak tanımlamış olup “*oral film*” şeklinde adlandırmıştır (201-203).

Özellikle çiğneme ve yutma güçlüğü yaşayan pediatrik, geriatrik ve onkolojik hasta grupları ve suya erişimi kısıtlı olan hasta popülasyonları için, dil üzerine yerleştirildikten sonra suya ve çiğnemeye gerek kalmadan tükürük ile hızla parçalanarak ADF formülasyonları, uygulama kolaylığı ve hasta uyuncunu önemli ölçüde artırmıştır. Bu da, son zamanlarda ADF'lere olan ilginin artmasını sağlamıştır (203-205).

ADF'ler ile ilgili ilk ticari ürün olan “*Listerine® Pocketpaks*”, nefes tazelemek amacıyla 2001 yılında Pfizer firması tarafından geliştirilmiştir ve Times dergisi tarafından en iyi buluş olarak kabul edilmiştir. Boğaz ağrısının tedavisinde kullanılmak üzere benzokain içeren “*Chloraseptic®Relief Strips*”, Zengen şirketinin bir sağlık yan kuruluşu olan InnoZen (Oxnard) firması tarafından 2003 yılında piyasaya sürülmüştür. Sistemik amaçlı bu formda geliştirilen ilk reçeteli

ilaçlar ise; “*Ondansetron Rapidfilm* (ondansetron)”, “*Zuplenz oral soluble film* (ondansetron, FDA tarafından onay almış ilk reçeteli ürün)”, “*Risperidon HEXAL® SF* (risperidon)”’dur (206, 207). Günümüzde özellikle Pharmathen S.A. ilaç firması tarafından pediatrik hasta grupları için hipertansiyon tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiş enalapril içeren patent alınmış ADF formülasyonları mevcuttur (206).

2.8.1. Ağızda Dağılan Film Formülasyonlarının Üstünlükleri ve Sakıncaları

Oral yoldan ilaç uygulamasına olanak sağlayan yeni bir teknoloji olan ADF formülasyonlarının aşağıda belirtildiği gibi birçok üstünlüğü bulunmaktadır.

-Yutma/çığneme güçlüğü (pediatrik, geriatrik ve psikotik hasta grupları) ve mide bulantısı şikâyeti olan (onkolojik) hastalar için oldukça uygun bir teknolojidir (206).

-İlaç kullanımı konusunda işbirlikçi olmayan hasta grupları için ise, kullanım sonrası uzaklaştırılmalarının (tükürülmesinin) zor olması nedeni ile yararlı bir tedavi seçeneğidir (208).

-Yutmak için suya gereksinimin olmaması nedeniyle suya erişimi zor olan hasta grupları (yatalak hastalar ve askerler gibi) için oldukça büyük bir kullanım kolaylığı sunmaktadır (205, 206).

-Damla ve şurup gibi sıvı dozaj formlarına kıyasla daha doğru ve kesin bir dozlama sağlanmaktadır (209).

- Alerjik atak, öksürük, bronşit veya astım atakları, taşit tutması gibi ani gelişen ve hızlı etki istenen hastalıkların tedavisi için oldukça uygun bir dozaj formudur (208-210).

- Tablet ve kapsül gibi geleneksel oral katı dozaj formları ile kıyaslandığında kullanılmaları sırasında boğulma hissi ve tıkanıklık gibi riskleri ortadan kaldırarak daha yüksek bir hasta güvenliği sağlamıştır (208).

-Ağızda kalıntı bırakmaması ve daha iyi bir his oluşturması ile pediatrik hastalarda ilaç kullanım zorluğunu ortadan kaldırmıştır (208).

-Çok ince olmaları ve geniş bir yüzey alanına sahip olmaları sayesinde ağız boşluğu mukozası ile daha etkin bir temas sonucu hızlıca dağılmakta ve çözünmektedir (207).

-Bazı ilaçların alındıktan sonra farinks ve özefagustan emilmeye başlaması uygulama dozunun ve istenmeyen yan etkilerin azaltılmasıyla daha gelişmiş bir biyoyararlanım sunabilmektedir (208, 210).

-Yüksek oranda damarlı bir yapıya sahip olan oral ve bukkal mukozadan yüksek oranda emilmeleri presistemik eliminasyonun azalması ile uygulama dozu ve dolayısıyla yan etki profilinin azalmasını sağlamıştır (211).

-Sıvı dozaj formlarına kıyasla (tüketilene kadar daha stabil kalmaları nedeni ile) saklama ve (esnek yapıları sayesinde) daha rahat taşıma/depolama avantajlarına sahiptir (207, 208, 210).

Tüm bu üstünlüklerinin yanı sıra, ADF'ler, bukkal pH'da stabil olmayan ve oral mukozayı tahriş eden etkin maddeler için uygun bir teknoloji değildir (208). Özellikle yüksek doz etkin madde yüklenememesi, ADF'lerin her etkin madde için uygulanabilir bir dozaj formu olmasını kısıtlamıştır. Bazı araştırmacılar ADF'lere yüklenebilecek ilaç dozunun en fazla 30 mg olabileceğini bildirirse de Novartis Consumer Health's firması tarafından, birim dozaj ağırlığının %50'sine kadar etkin madde yüklenebildiği gösterilmiştir. Bu firma tarafından geliştirmiş olan "*Gas-X*[®]" isimli üründe, her şerit için 62,5 mg simetikon etkin maddesi kullanılmıştır (207). Günümüzde potansiyel ilaç adayı olarak patent başvurusu yapılmış yüksek doz etkin madde içeren ürünler mevcuttur (206). Bu ürünlere ait etkin madde ve doz bilgileri Tablo 2.5.'de özetlenmiştir. ADF'lerin üretim teknolojisi açısından karşılaştığı bir diğer zorluk, içerik tekdüzeliğinin istenilen düzeyde sağlanamaması problemidir. Literatürde bu sorunun giderilmesinde bireysel dozlama sunan kalıpların kullanılmasının önerildiği çalışmalar bulunmaktadır (198). Nemli ortamlarda stabil olmamaları, nemden korunmaları için özel bir paketlenme işlemine gereksinim duyulması ve bu özel paketlenme işleminin ürün maliyetini artırması ADF'lerin diğer kısıtlamalarıdır (208, 209).

Tablo 2.5. ADF formülasyonları için potansiyel ilaç adayları (206).

Etkin madde	Doz (mg)
Akrivastin	8
Amlodipin besilat	2,5-10
Atorvastatin	5-80
Azatadin maleat	1
Bromfeniramin maleat	4
Deksbrofeniramin	2
Deksklorfeniramin	2
Dekstrometorfan hidrobromür	10-30
Difenhidramin hidroklorür	12,5-25
Eletriptan	10-40
Famotidin	5-10
Fenilefrin hidroklorür	5-10
Ketoprofen	12,5-25
Klorfeniramin maleat	4-12
Loperamid	2
Loratadin	5-10
Nikotin	1-15
Nitrogliserin	0,3-0,6
Psödoefedrin hidroklorür	15-60
Rofekoksib	5-25
Sertralin hidroklorür	10-100
Setirizin	5-10
Sildenafil	25-100
Sumatriptan süksinat	35-70
Tripolidin hidroklorür	2,5
Valdekoksib	5-20
Ziprasidon	20-80
Zolmitriptan	2,5

İdeal bir ADF'in ince ve esnek olması, yapışkan olmaması, dağılma süresinin kısa olmasına karşı kabul edilebilir mekanik özelliklere sahip olması, kullanım sonrası ağızda hoş bir his bırakması, tükürük sıvısında çözünmesi ve tükürük pH'sında stabil olması istenmektedir (205).

2.8.2. Ağızda Dağılan Film Formülasyonları'nda Kullanılan Yardımcı Maddeler

ADF formülasyonlarında, etkin madde (%5-30, a/a) haricinde film oluşturucu polimer (%40-50, a/a), plastizer (plastikleştirici) (%0-20, a/a), tükürük uyarıcı madde (%2-6, a/a), renklendirici (%0-1, a/a), yüzey aktif madde (yeterli miktarda), tatlandırıcı (%3-6, a/a), koku maddeleri (aroma vericiler) (yeterli miktarda), stabilize edici ve kıvam artırıcı maddeler (%0-5, a/a) gibi farklı tiplerde yardımcı maddeler kullanılmaktadır (212). ADF'lerde kullanılan etkin maddelerin istenen nihai salım profiline bağlı olarak öğütülebilir, mikronize edilebilir veya nanokristal ya da partiküler halde ADF'lere yüklenebileceği bildirilmiştir (213).

ADF'in genel mukavemetinden sorumlu olan polimerler, istenen film özelliklerine ulaşılabilmek için tek başına ya da kombine halde kullanılabilir. Bir ADF'in sağlamlığı kullanılan polimerin türü ve oranına göre değişmektedir. İdeal bir ADF formülasyonunun geliştirilmesinde uygun polimer ve oranı seçiminin haricinde filmin bütünlüğünden sorumlu film oluşturucu polimerin, saf olması, iritan ve toksik olmaması, iyi ıslanabilir özelliklere sahip olması, ucuz ve kolay ulaşılabilir olması istenmektedir. Genel olarak ADF formülasyonlarında uygun mekanik özelliklere sahip olması, hızla dağılması ve ağızda hoş bir his bırakması nedeniyle düşük molekül ağırlıklı (1000-9000 Da) suda çözünen polimerler daha çok tercih edilmektedir. ADF formülasyonlarında pullulan, nişasta/modifiye nişasta (*Maltrin*[®], *Lycoat*[®], *Instant Pure-Coat*[®]), sodyum aljinat, pektin, jelatin ve polimerize resin gibi doğal polimerlerin yanı sıra HPC, HPMC (*Kollocoat*[®] *IR*), NaCMC, PVA, Polietilen oksit (PEO)(*Polyox*TM), PVP gibi sentetik polimerler kullanılmaktadır (210, 212, 214).

Pullulan

İlk kez 1958 yılında Bernier tarafından rapor edilen pullulan, gıda katkı maddesi ve farmasötik bir ajan olarak geniş bir yelpazede patentli uygulamalarına ek olarak Amerika'da "Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen" (Generally Regarded As Safe - GRAS) bileşenler statüsünde yer alması ile güvenli bir geçmişe sahiptir (214-217). Pullulan, endüstriyel boyutta bir maya çeşiti olan *Aureobasidium*

pullulans'tan bir dizi fermentasyon süreci sonunda elde edilen, doğal, nötr ve suda çözünebilen bir polisakkarittir (218). Pullulan iyi bir film oluşturma özelliğinin yanı sıra düşük oksijen geçirgenliğine sahiptir. Aynı zamanda toksik değildir ve biyolojik olarak parçalanabilir özellikte bir polimerdir (219). Film oluşturu polimer olarak pullulanın kullanıldığı ağızda dağılan filmlerde, sıcak ve soğuk suda rahatlıkla çözünebilen berrak bir çözelti oluşması ile esnek filmlerin elde edilebildiği ve pullulan bazlı filmlerin genellikle hızlı dağıldığı bildirilmiştir (214).

ADF'lerin esnekliğinin artırılması ve kırılabilirliğinin azaltılması gibi mekanik özelliklerinin iyileştirilmesinden sorumlu en önemli bileşen plastikleştiricilerdir. Plastikleştiriciler, filmlerin uzama ve gerilme direnci gibi mekanik özelliklerini polimerin camsı geçiş sıcaklığını düşürerek sağlamaktadır. Çözücü tipi ve polimer ile geçimliliğine dikkat edilerek plastikleştiricilerin seçilmesi önerilmektedir. Plastikleştiricinin formülasyon bileşimine uygun olmaması durumunda filmde çatlama, yarıma ve kenardan kopma gibi sorunlar görülmektedir (212). Ayrıca bazı plastikleştiricilerin etkin maddenin emilim hızında da etkin rol oynadığı bildirilmiştir. ADF'lerin geliştirilmesinde en sık kullanılan plastikleştiriciler; propilen glikol (PG), gliserol, düşük molekül ağırlığına sahip PEG'ler, dimetil, dietil ve dibütül ftalat gibi ftalat türevleri, asetil, trietil ve tribütül sitrat gibi sitrat türevleri ve hint yağıdır. Kullanılan plastikleştiricinin türü, ADF üretimi sürecinde kuruma prosesini de etkilemektedir. Pullulan bazlı ADF'lerin hazırlanmasında kullanılan PEG ve PG gibi plastikleştiricilere kıyasla gliserol ile hazırlanan filmlerin daha uzun sürede kuruduğu bildirilmiştir (198, 220). Literatürde ayrıca pullulan bazlı ADF'lerin hazırlanmasında plastikleştirici olarak sorbitolün kullanıldığı çalışmalar da mevcut olup, bu plastikleştiricinin kullanıldığı ADF'lerde sertlik ve kırılabilirlik problemi yaşanmıştır (198).

ADF formülasyonlarında kötü tadın maskelenmesi ve lezzetin iyileştirilmesi amacıyla formülasyona eklenen tatlandırıcılar özellikle pediatrik hasta grupları için önemlidir. ADF formülasyonlarında sorbitol, mannitol, ksilitol, maltoz, dekstroz, sükröz, ksiloz, riboz, glukoz, mannoz, galaktoz, früktoz gibi doğal tatlandırıcıların yanı sıra aspartam, sakkarin, siklamat, asesülfam-K, sükraloz, alitam ve neotam gibi yapay tatlandırıcılar da kullanılmaktadır (205, 212).

Aroma verici koku maddeleri ve renklendiriciler ADF'lerin kabul edilebilirliğini artırmak için kullanılmakla birlikte aromatan seçimi, yaş gruplarının tat zevkine ve kullanılan etkin maddeye göre değişebilmektedir. Pediatrik hasta grupları için geliştirilen ADF'lerde aroma verici koku maddesi olarak portakal aromasının kullanıldığı bildirilmiştir (221). Bunların yanı sıra nane yağı, tarçın yağı, yeşil nane yağı, hindistan cevizi yağı gibi aroma yağları, vanilya, kakao, kahve, çikolata ve narenciye gibi meyveli aromalar ve elma, ahududu, kiraz, ananas gibi meyve özü aromaları ADF'de sıklıkla kullanılmaktadır. Kullanılacak aromanın türü ve miktarı, tat maskeleyen için duyulan gereksinime göre değişmekle birlikte, aromanın gücünü ve bırakılan etkiyi artırmak için monometil süksinat gibi serinletici (cooling) maddeler de sıklıkla tercih edilmektedir (212). ADF formülasyonlarında genellikle FD&C onaylı doğal renklendirme ajanları, doğal meyve suyu konsantreleri, titanyum dioksit ve silikon dioksit gibi pigmentler renklendirme amacıyla kullanılmakla birlikte formülasyondaki oranlarının %1'i geçmemesi gerektiği bildirilmiştir (210).

Tükürük uyarıcı ajanlar, tükürük üretimini artırarak ADF formülasyonlarının daha hızlı dağılmasına katkıda bulunan yardımcı maddelerdir. Bu amaçla daha çok sitrik asit olmak üzere malik asit, laktik asit, askorbik asit ve tartarik asit gibi gıdalarda kullanılan asitler kullanılmaktadır. Çözünürlüğü düşük olan etkin maddelerin ADF formülasyonlarının hazırlanmasında, nihai ürünün çözünürlük özelliklerini iyileştirmek amacıyla çeşitli yüzey aktif maddelerden faydalanılmaktadır. Yüzey aktif maddeler çözüdürücü, ıslatıcı veya dağıtıcı olarak görev almakla birlikte bu amaçla daha çok poloksamer 407, SLS, benzalkonyum klorür, tween ve spanlar kullanılmaktadır. Stabilize edici ve kıvam artırıcı ajanlar ise, genellikle film çözeltisi ya da dispersiyonunun viskozitesi ve kararlılığını artırmak amacıyla kullanılan yardımcı maddelerdir. Ksantan ve keçiyoynuzu zamkı, karragenan ve selülozik türevler ADF formülasyonlarında daha çok tercih edilen stabilize edici ve kıvam artırıcı maddelerdir (212, 220).

2.8.3. Ağızda Dağılan Film Formülasyonlarının Hazırlanması

ADF'lerin üretiminde her ne kadar çözücü dökme (*solvent casting*), yarı katı dökme (*semi-solid casting*), sıcak eriyik (*hot-melt*) ekstrüzyon, katı dispersiyon,

yuvarlama (*rolling*), püskürterek kurutma (*spray-dry*) ve baskı (*printing*) yöntemi gibi çeşitli yöntemler kullanılsa da pratikte bunlardan daha çok çözücü dökme ile sıcak eriyik ekstrüzyon yöntemlerinin kullanıldığı bildirilmiştir (207, 209).

Çözücü dökme yöntemi, genellikle su/su-alkol karışımları içinde hazırlanan etkin madde ve diğer yardımcı madde çözelti/süspansiyonlarının kalıplara dökülmesi, oda sıcaklığında ya da etüvde kurutulması ve istenilen boyutta kesilmesi esasına dayanmaktadır. Etkin maddenin çözünmesi için karıştırma aşamalarında bazen ısı uygulaması yapılabilmekte ve sistem içindeki hava kabarcıklarının uzaklaştırılması için elde edilen jel karışım belli süre bekletilebilmektedir. Jel karışımın aktarıldığı kalıp yüzeyleri cam, plastik ve teflon olabildiği gibi propilen ya da polivinil klorür ve polietilen tereftalat gibi inert maddelerden de seçilebilmektedir. Kullanılan çözücünün uzaklaştırılması amacıyla sıcak ekstrüzyon yöntemine kıyasla bu yöntemde daha düşük sıcaklıklar kullanıldığı için ısıya hassas etkin maddelerin ADF'lerinin hazırlanmasında daha uygun bir yöntem olarak tercih edilmektedir (207, 208).

Yarı katı dökme yönteminde, öncelikle polimerin sulu çözeltisi hazırlanmakta ve asitte çözünmeyen selüloz asetat ftalat, selüloz asetat bütirat gibi polimerler, amonyum ya da sodyum hidroksit içerisinde dağıtılıp bu çözeltiye ilave edilmektedir. Daha sonra uygun miktarda plastikleştiricinin eklendiği jel karışım ısı kontrollü tamburlar kullanılarak film ya da şeritlere aktarılıp kurutulmaktadır (208-210).

Sıcak eriyik ekstrüzyon yöntemi, ADF formülasyon içeriğini oluşturan maddelerin kuru halde karıştırıldıktan sonra yüksek sıcaklıkta ekstrüzyonla homojen bir kütle halinde eritilmesi, ekstrüzyon kalıbından geçmeye zorlanarak düşük sıcaklıkta kurutulması ve istenilen boyutta kesilmesi esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde çözücü kullanılmadığından çözücü dökme yönteminde olduğu gibi bir çözücü kalıntı problemi görülmemektedir, fakat ekstrüzyon sırasında yüksek sıcaklıkların kullanılması yöntemin ısıya hassas maddelere uygulanmasını sınırlandırmaktadır. Ayrıca özel ekipmanların gereksinimi maliyetin artmasına da neden olmaktadır (210, 214).

Son zamanlarda yöntemin esnekliği ve maliyet etkinliği açısından ilaç endüstrisinde giderek önem kazanan *baskı yöntemi*, aktif farmasötik bileşenlerin bir film tabakası üzerine basılması esasına dayanmaktadır. Bu amaçla daha çok fleksografik baskı kullanılmaktadır. Teorik olarak, baskı yönteminin etkin maddenin film içinde daha homojen dağılması ve doğru dozajlanmasına önemli bir katkı sağladığı bildirilmiştir. *Yuvarlama yönteminde*, spesifik reolojik özelliklere sahip olan etkin madde ve polimer çözelti ya da süspansiyonu bir taşıyıcı üzerinde yuvarlanmaktadır. Makaralar üzerinde kuruyan film istenilen boyutta kesilmektedir. Bu yöntemde çözücü olarak daha çok su ve su-alkol karışımları kullanılmaktadır. *Katı dispersiyon yönteminde*, PEG'in içinde çözünmeyeceği bir çözücü içinde çözünen maddeler, PEG eriyiğinin içine eklenmektedir. Oluşan katı dispersiyonlar kalıplara aktarılıp kurutulduktan sonra istenilen boyutlarda kesilmektedir. *Püskürterek kurutma yönteminde* ise, uygun bir çözücü içinde çözünen ADF içeriği çözültisi cam, polietilen film veya teflon tabakası gibi yüzeylere püskürtülmekte ve daha sonra kurutulup soyularak istenilen boyutlarda kesilmektedir (207-210).

ADF'lerin kesilme ve ambalajlama işleminin bekletme esnasında ürünün özelliklerinin değişebilme ihtimaline karşı hazırlanır hazırlanmaz yapılması gerektiği bildirilmiştir. Tekli ve çoklu ambalajlama seçenekleri bulunmakla birlikte filmlerin birbirine yapışma problemi nedeniyle genellikle primer ambalajda tekli paketlenme tercih edilmektedir. ADF'lerin ambalajlanması için en ideal ve en çok kullanılan materyal alüminyum folyodur (212).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1 1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

2-Hidroksi-5-nitrobenzaldehit	Sigma-Aldrich/ABD
4,4-Dimetil-1,3-sikloheksandion	Sigma-Aldrich/ABD
96 kuyucuklu plaka	Therno Scientific/ABD
Absolü alkol	Sigma-Aldrich/ABD
Amonyum asetat	Sigma-Aldrich/ABD
Aseton	Sigma-Aldrich/ABD
Asetonitril (HPLC Grade)	Sigma-Aldrich/ABD
Aspartam	Yiğit Kimya/Türkiye
Benzil asetoasetat	Sigma-Aldrich/ABD
Dekstran	Merck-Millipore/Almanya
Dekstroz (D-(+)-glukoz)	Merck-Millipore/Almanya
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Sigma-Aldrich/ABD
DMSO (Dimetil sülfoksit (steril))	Applichem GmbH/Almanya
Etanol	Sigma-Aldrich/ABD
Etil asetat	Sigma-Aldrich/ABD
FDC Yeşili (FD&C Green, No 3 (Fast Green FCF))	Merck-Millipore/Almanya
HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution)	Biochrom AG/Almanya
HEPES tampon çözeltisi (1M)	Corning/ABD
Hidroklorik asit (HCl, %37-39)	Merck-Millipore/Almanya

HPLC Inert Sustain® C18 Kolon (150mm×4.6 mm, 5µm)	Ant Teknik/Türkiye
Hücre kültür kapları (Flask, T25 (25 cm ²), T75 (75 cm ²))	Greiner Bio- One/Almanya
Hücre kültürü insertleri (Transparan)	ThinCerts™ Cell Culture Inserts; 1,0 µm, 12 well plate, Greiner Bio- One/Almanya
L-glutamin (200mM)	Biochrom AG/Almanya
Mannitol (D-(-)-mannitol)	Merck-Millipore/Almanya
Membran filtre (0,22 µm/0,45 µm)	Merck-Millipore/Almanya
Metanol (HPLC Grade)	Sigma-Aldrich/ABD
MTT (Metil tiyazol tetrazolyum bromür)	Applichem GmbH/Almanya
PBS (Phosphate buffered saline, 10x)	Biochrom AG/Almanya
PEG 200 (Poliyeten glikol 200)	Drogsan Pharmaceuticals/Türkiye
Penisilin-Streptomisin çözeltisi (100x)	Cegrogen Biotech GmbH/Almanya
Poloksamer 188 (Kolliphor®P 188)	Merck-Millipore/Almanya
Poloksamer 407 (Kolliphor®P 407)	Merck-Millipore/Almanya
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	Merck-Millipore/Almanya
Potasyum Klorür (KCl)	Sigma-Aldrich/ABD
Propilen glikol	Merck-Millipore/Almanya
Pullulan	Nagase Co., Ltd./Almanya
PVA (Polivinil alkol, Mw 30-70 Da)	Drogsan Pharmaceuticals/Türkiye
PVP K30 (Polivinil prolidon K30)	Drogsan Pharmaceuticals/Türkiye
SDC (Sodyum deoksikolat)	Sigma-Aldrich/ABD
SLS (Sodyum lauril sülfat)	Merck-Millipore/Almanya

Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat (NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O)	Merck-Millipore/Almanya
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Merck-Millipore/Almanya
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich/ABD
SoluPlus®	BASF Pharma/Almanya
Sükroz (D-(+)-sakkaroz)	Merck-Millipore/Almanya
Şırınga filtre (Steril, CA, 0,22 µm)	Merck-Millipore/Almanya
Trehaloz (D-(+)-trehaloz dihidrat)	Sigma-Aldrich/ABD
Tripan mavisi	Sigma-Aldrich/ABD
Tripsin (%0,25)-EDTA (%0,02) çözeltisi (5x)	Biochrom AG/Almanya

3.1.2. Kullanılan Biyolojik Maddeler

A549 (İnsan akciğer kanseri hücre hattı) Hücreleri	American Type Culture Collection (ATCC)/ABD
Caco-2 (İnsan epitel kolorektal adenokarsinoma hücre hattı) Hücreleri	American Type Culture Collection (ATCC)/ABD
FBS (Fetal Bovine Serum)	Biochrom AG/Almanya
L929 (Fare fibroblast hücre hattı) Hücreleri	American Type Culture Collection (ATCC)/ABD
MCF-7 (İnsan meme kanseri hücre hattı) Hücreleri	American Type Culture Collection (ATCC)/ABD
SK-BR-3 (İnsan meme kanseri hücre hattı) Hücreleri	American Type Culture Collection (ATCC)/ABD

3.1.3. Kullanılan Cihazlar

Ambalaj kapatma cihazı	SMPY202 20cm Masaüstü Manuel Poşet Ağzı Kapatma Makinası Demir/Türkiye
------------------------	---

Biyogüvenlik kabini (Laminar flow)	Faster BHG 2004 Biolab, Class 2/İtalya
Çözünme hızı tayin cihazı	CH-4312 Sotax çözünme hızı tayin cihazı/İsviçre
Diferansiyel Taramalı Kalorimetre (DSC) Cihazı	DSC Q 100 system, TA Instruments, Delaware/USA
Dijital mikrometre	Mitutoyo Digimatic Micrometer IP65/Japonya
Elektrik rezistans sistemi (Millicell-ERS)	Merck Millipore/Almanya
Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrofotometresi	Perkin - Emler/ABD
Hassas terazi	Shimadzu AX200/Japonya
Hemasitometre	Marienfeld Haemacytometer Laboratory Glassware/Almanya
İnverted mikroskop Leica DMIL, DFC 320 kamera sistemi ve software	Leica/Almanya
Karbondioksit inkübatör	Sanyo MCO-18AIC/Japonya
Liyofilizatör	Labconco FreeZone 4.5 Liter Benchtop Freeze Dryer/ABD
Manyetik karıştırıcı	IKA RET B/Almanya
Mikroplaka okuyucu	VersaMax, Molecular Devices Co./ABD
Millipore MilliQ su saflaştırma sistemi	Millipore Milli-Q-POD/ABD
Nem tayin cihazı	Ohaus MB45/İsviçre
Partikül Büyüklüğü Tayin Cihazı	Malvern Mastersizer 2000/İngiltere
Partikül Büyüklüğü Tayin Cihazı	Malvern Zetasizer NanoZS/İngiltere
pH metre	HannaInstruments HI 3220/USA

Refraktometre	SCHMIDT HAENSCH ATRW2/Almanya
Soğutmalı versatile santrifüj	SİGMA 3-16K/Türkiye
Taramalı Elektron Mikroskobu	QUANTA 400F Field Emission SEM, Thermo Fisher Scientific, MA/USA
Texture Analyzer cihazı	A.XT. Plus Texture Analyzer, Stable Micro Systems/UK
Ultrasonik prob	Bandelin Sonopuls HD 2200 Homojenizatör, Bandelin Electronic GmbH & Co. KG/Almanya
Ultrasonik su banyosu	Advantage-Lab AL04-12/ABD
UV Spektrofotometre	Shimadzu UV-1700/Japonya
X-Işını Difraktometresi	Ultima X-ray diffractometer, Ultima X-ray diffractometer/Tokyo, Japan
Yatay çalkalayıcı su banyosu	Memmert/Almanya
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi	Agilent 1200/Almanya

3.2. Yöntemler

3.2.1. M3, Nanosüspansiyon, Nanokristal ve Ağızda Dağılan Film Formülasyonları'nın Fizikokimyasal Özellikleri Üzerine Yapılan Çalışmalar

M3, nanosüspansiyon, nanokristal ve ağızda dağılan film formülasyonlarının fizikokimyasal özelliklerini tayin etmek amacıyla; ultraviyole (UV) spektrum taraması, refraktif indeks, partikül büyüklüğü dağılımı, taramalı elektron mikroskop (SEM), X-ışını kırınımı (XRD), fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi (FT-IR) ve diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC) analizleri yapılmıştır.

UV Spektrum Analizi

Etkin maddenin miktar tayini ve validasyon çalışmalarından önce maksimum absorbans verdiği dalga boyu tespit edilmiştir. Bu amaçla etkin maddenin metanol:asetonitril:su (35:40:25, h/h/h) çözücü ortamında 6,25 µg/mL konsantrasyonundaki çözeltisi hazırlanmıştır. UV spektrofotometre (Shimadzu UV-1700 Spektrofotometre, Japonya) cihazı ile 1x1 kuartz küvetler kullanılarak 200-800 nm dalga boyu aralığında tarama yapılmış ve etkin maddenin maksimum absorbans verdiği dalga boyu kaydedilmiştir.

Refraktif İndeks Analizi

Bir maddenin refraktif indeksi (kırılma indisi), o maddenin erime, kaynama, donma noktası ve yoğunluğu gibi kendine has bir fiziksel özelliktir ve belirli koşullar altında sabit bir değerdir. Bu özellikten yararlanılarak maddelerin tanınması veya kalitatif analizler yanında, refraktif indeks ile konsantrasyon arasındaki ilişkidten yararlanılarak kantitatif analizler de yapılabilmektedir. Elektromanyetik radyasyon bir yüzeye çarptığı zaman ya yukarı doğru yansıtılmakta ya da belli bir açı ile kırılarak yoluna devam etmektedir. Refraktif indeks, temel olarak geliş açısının sinüsünün kırılma açısının sinüsüne oranı ile tespit edilmektedir.

Etkin maddenin partikül büyüklüğü analizi ve formülasyon çalışmalarında kullanılmak üzere öncelikle refraktif indeks analizi yapılmıştır. Bu amaçla M3'ün asetonunda (formülasyon çalışmalarında kullanılan organik çözücü) 0,78 µg/mL, 1,25 µg/mL ve 2 µg/mL olmak üzere üç farklı konsantrasyonda çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözeltiler $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ 'de üç tekrarlı olacak şekilde “*SCHMIDT HAENSCH ATRW2 Dijital Refraktometre*” cihazı kullanılarak ve cihazın ilgili kısmına hazırlanan çözelti örneklerinden damlatılması suretiyle analiz edilmiştir (Şekil 3.1.). Tekrarlı ölçüm değerleri ile konsantrasyon değerlerinden elde edilen kalibrasyon doğrusunun x eksenini ile kesişim noktası etkin maddenin refraktif indeksi olarak kaydedilmiştir. Refraktif indeks analizleri Ortadoğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvar'ında yapılmıştır.



Şekil 3.1. Refraktif indeks ölçümü.

Partikül Büyüklüğü Analizleri

M3'ün sentez sonrası herhangi bir işlem uygulanmaksızın sahip olduğu partikül büyüklüğü analizi için “*Malvern Mastersizer 2000*” cihazı kullanılmıştır. Öncelikle 30 mg M3, 5 mL distile suda dağıtılarak dispersiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan dispersiyonun partikül büyüklüğü dağılımını ölçmek için, iç faz olan M3'ün refraktif indeksi 1,3582 ve dış faz olan distile suyun refraktif indeksi 1,3300 olarak sisteme girilmiştir. Ölçümler 6 kez tekrarlanmıştır. Formülasyon çalışmaları sırasında hazırlanan nanosüspansiyon ve liyofilize edilmiş katı toz halindeki nanokristal formülasyonlarının ortalama partikül büyüklüğü ve polidispersite indeksi (PDI), foton korelasyon spektroskopisi yöntemi ve formülasyonların zeta

potansiyel değerleri, partiküllerin elektroforetik hareketliliği esasına göre “*Malvern Zetasizer NanoZS*” cihazı kullanılarak geręekleřtirilmiřtir. Tüm ölçümler 3 kez tekrarlanmıştır.

Taramalı Elektron Mikroskop Analizleri

Etkin maddenin, hazırlanan nanokristal ve ağızda dağılan film formülasyonlarının yüzey morfolojisi, şekilleri ve partikül boyutunu incelemek amacıyla öncelikle metal yuvarlak halkalar üzerinde çift taraflı bantlar yardımı ile hazırlanan numuneler altın - palladyum ile kaplanmıştır. Kaplama işlemi sonrası numuneler 20 kV akselerasyon voltajında “*QUANTA 400F Field Emission SEM*” cihazı kullanılarak analiz edilmiş ve farklı büyütme oranlarında görüntüler kaydedilmiştir. Ağızda dağılan film formülasyonlarının yüzey görüntülemesine ek olarak enine kesit görüntüleri de alınmıştır. SEM analizleri Ortadoğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvar’nda yapılmış olup analizler sırasında hazırlanan numuneler ve görüntüleme cihazı şekil 3.2.’de gösterilmiştir.



şekil 3.2. SEM analizleri sırasında hazırlanan numuneler ve görüntüleme cihazı.

Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Analizleri

Sıcaklık değişimine karşı katı bir maddenin fiziksel ve kimyasal reaksiyonlar sonucunda değişen özelliklerinin ölçülmesi ve yorumlanması esasına dayanan termal analizlerden DSC analizinde test örneği ve referansı aynı sıcaklıkta tutmak için gerekli olan enerji ölçümü yapılmaktadır. Temelde maddenin ısı kapasitesinin sıcaklıkla nasıl değiştiğini incelemek amacıyla kullanılan bir analizdir.

Etkin maddenin, hazırlanan nanokristal ve ağızda dağılan film formülasyonlarının DSC analizleri Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi İlaç ve Kozmetik AR-GE ve Kalite Kontrol Laboratuvarı (HÜNİKAL)'nda “*DSC Q 100 system*” cihazı kullanılarak yapılmıştır. Alüminyum pan içerisine tartılan numunelerin (3-5 mg) DSC termogramları 50 mL/dak.'lık azot atmosferi altında ve 10°C/dak. hızda 0-400°C sıcaklık aralığında çekilmiştir.

X-Işını Kırınımı Analizleri

XRD ile madde üzerine X-ışını gönderilerek ışının saçılım özelliği gösterip göstermediği değerlendirilmektedir. Amorf yapıdaki maddeler herhangi bir saçılma örneği göstermezken kristal yapıdaki maddeler, maddenin kristal örgüsüne spesifik tekrarlanabilir bir pik deseni vermektedir. Maddenin amorf ya da kristal yapıda olması, bu yapıların termodinamik açıdan dayanıklılık ve çözünürlük gibi birçok özelliğinin birbirinden farklı olması sebebi ile formülasyon çalışmaları açısından oldukça önemlidir.

Etkin maddenin, hazırlanan nanokristal ve ağızda dağılan film formülasyonlarının XRD analizleri Ortadoğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvar'ında “*Ultima X-ray diffractometer*” cihazı kullanılarak yapılmıştır. Analizler toz numuneler için 2°/dak. ve ağızda dağılan filmler için ise 1°/dak. tarama hızında, 40 kV voltajda ve 0-55 (2θ) tarama aralığında gerçekleştirilmiştir.

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi Analizleri

Moleküllerin infrared spektrumları yardımıyla yapılarının aydınlatılması esasına dayanan FT-IR analizleri ile katı ya da sıvı halindeki organik bileşiklerin yapılarındaki fonksiyonel gruplar, yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri ve yapının aromatik ya da alifatik olup olmadığı belirlenebilmektedir.

Etkin maddenin, hazırlanan nanokristal ve ağızda dağılan film formülasyonlarının FT-IR spektrumları "*Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektrofotometre*" cihazı kullanılarak 4000–600/cm⁻¹ dalga sayısı aralığında çekilmiş ve değerlendirilmiştir.

3.2.2. Çözünürlük Çalışmaları

M3'ün çözünürlük çalışmaları için WHO tarafından 2018 yılında yayınlanan protokolde belirtilen koşullar dikkate alınmıştır (94). İlgili kılavuz başlangıç noktası olarak aktif farmasötik bileşenden (API) çözünürlüğün ön tahmini için açık kaynaklı araçların (çizim programları) kullanılmasını önermektedir. Bu amaçla önerilen programlarda öncelikle yeni sentez ürünü olan ilaç adayı molekülün açık kimyasal formülü çizilmektedir. Sonrasında program otomatik olarak moleküle ait tahmini moleküler ağırlık, çözünürlük, Log P ve P-gp substratı olup olmama özellikleri hakkında bilgiler sunmaktadır. Buradan elde edilen bilgiler çözünürlük çalışmaları sırasında kullanılacak madde miktarlarının (kılavuzda ilgili çözücü içinde çözüneceği madde miktarından %30-40 kadar fazla madde kullanılması gerektiği bildirilmiştir) belirlenmesinde de oldukça fayda sağlamaktadır. Bu amaçla M3'ün tahmini çözünürlük değeri ve yaklaşık %30-40 çözünmez olması için gereken katı miktarı "<http://www.swissadme.ch>" adresinden hesaplanmıştır.

M3'ün çözünürlük çalışması, ilgili kılavuzda önerilen 3 farklı pH (pH 1,2 HCl, pH 4,5 Asetat, pH 6,8 Fosfat tamponları) ve su ortamında (3 mL), amber renkli cam vialler kullanılarak, 80 devir/dak. hızda ve 37 ± 1°C sıcaklıkta, yatay çalkalayıcı su banyosunda, 2, 24, 48 ve 72 saat sonunda toplanan örneklerin daha önceden geliştirilen ve valide edilen yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile analiz edilmesi suretiyle gerçekleştirilmiştir (n=3). Örnekler analiz

edilmeden hemen önce 0,45 µm por açıklığına sahip selüloz asetat (CA) filrelerden süzölmüştür.

Kılavuzda maddeye ait çözünlük değeri, farklı bekletme sürelerinde yapılan analizlerle oluşturulan çözünlük (µg/mL)-zaman (saat) grafiğinde eğrinin sabitlendiği nokta olarak bildirilmiştir. Ayrıca WHO 2018 kılavuzuna göre; etkin maddenin çözünlüğünün düşük ya da yüksek olma durumu “DSV (The dose: solubility volume : Çözünlük hacmi (mL))” hesabına göre yapılmaktadır. DSV, etkin maddenin en yüksek terapötik dozunu en düşük çözünlüğün gözlemlendiği pH'da tamamen çözmek için gerekli sıvı hacmini temsil etmektedir. “mg /mL” cinsinden hesaplanan en düşük çözünlüğe dayanarak DSV, en yüksek terapötik dozun (mg cinsinden), çalışmada elde edilen çözünlüğe (mL başına mg cinsinden) bölünmesiyle hesaplanmaktadır. DSV; 1,2-6,8 pH aralığının tamamında 250 mL'den az olduğunda bu etkin maddenin yüksek oranda çözünür olduğu kabul edilmektedir. M3'ün çözünlüğünün düşük ya da yüksek olma durumun belirlenebilmesi için kılavuzun önerdiği gibi DSV değerleri hesaplanmıştır ve elde edilen sonuçlar hem açık erişimli kaynağın bildirdiği tahmini sonuçlar hem de ticari DHP'lerin çözünlük değerleri ile kıyaslanmıştır.

Ayrıca fiziksel karışım (FK-1) ve dondurularak kurutulmuş nanokristal formülasyonlarının (M3-NK) sudaki çözünlüğü, kılavuzda belirtildiği gibi M3'ün çözünlük çalışmaları ile aynı koşullar altında 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir.

3.2.3. İn vitro Çözünme Hızı Çalışmaları

M3, fiziksel karışım-1 (FK-1), nanosüspansiyon (M3-NS), nanokristal (M3-NK) ve ADF formülasyonlarının (M3-ADF) in vitro çözünme hızı çalışmaları “Sotax çözünme hızı tayin cihazı” kullanılarak tayin edilmiştir. Çözünme ortamı ve analiz koşulları olarak FDA tarafından ticari DHP türevlerinden amlodipin besilat ağızda dağılan tablet (ADT) formülasyonları için önerilen koşullar temel alınmıştır (222). Bu amaçla 0,12 mg etkin madde ve 0,12 mg etkin madde içeren formülasyonlar Tablo 3.1.'de belirtilen koşullar kullanılarak her bir seri için 6 tekrarlı olacak şekilde çözünme hızı tayin edilmiştir. Çözünme hızı tayin yöntemine göre belirlenen sürelerde örnekler alınmıştır ve her birine eksilen miktar kadar

37°C'deki çözünme ortamından ilave edilmiştir. Toplanan örnekler valide HPLC yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen % çözünen M3 değerleri zamana karşı grafiğe geçirilerek çözünme hızı profilleri oluşturulmuştur.

Tablo 3.1. M3 ve formülasyonların in vitro çözünme hızı çalışmalarında kullanılan koşullar (222).

Cihaz yöntemi	Aparat 2 (Pedal yöntemi)
Aparat dönme hızı (rpm)	50
Çözünme ortamı	0,01 N HCl
Çözünme ortamı miktarı (mL)	500
Çözünme ortamı sıcaklığı (°C)	37 ± 0,5
Analiz süreleri (dak.)	2,5-5-7,5-10-15-20-25-30-45-60
Örnek hacmi (mL)	2

3.2.4. M3'ün İn vitro Miktar Tayin Yöntemi'nin Geliştirilmesi ve Validasyon Çalışmaları

DeneySEL çalışmalarda M3'ün miktar tayininde kullanılabilen en uygun analitik yöntemin geliştirilebilmesi için literatür bilgileri doğrultusunda ön denemeler yapılmıştır. Literatürde DHP türevi etkin maddelerin HPLC miktar tayini yöntemlerinde mobil faz sistemi olarak metanol:asetonitril:su, metanol:asetonitril:pH 3,0 trietilenamin çözeltisi, metanol:su, metanol:pH 4,0 sodyum asetat, asetonitril:pH 4,8 potasyum dihidrojen fosfat monobazik (KH₂PO₄) gibi karışımların kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca çalışmaların hemen hemen hepsinde sabit faz olarak C₁₈ kolon sistemi kullanılmıştır (66, 80, 83, 223-225). Ön denemelerden elde edilen bulguların ışığında M3'ün miktar tayininde kullanılmak üzere geliştirilen kromatografik yöntem koşulları Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. M3'ün miktar tayininde kullanılmak üzere geliştirilen kromatografik yöntem koşulları.

Cihaz	HPLC Agilent 1200 (Almanya)
Mobil Faz (h/h/h)	Metanol:Asetonitril:Su (35:40:25)
Analitik Kolon	Inert Sustain® C18 (4,6 x 150 mm, 5 µm)
Enjeksiyon Hacmi (µL)	20
Akış Hızı (mL/dak.)	1
Dedektör	Diode Array Dedektör (DAD)
Analiz Sıcaklığı (°C)	25
Analiz Süresi (dak.)	10
Dalga Boyu (nm)	241

Analitik yöntem validasyon çalışmaları Uluslararası Uyum Konseyi (ICH) ve WHO tarafından 2015 ve 2018'de yayınlanan protokollerde belirtilen koşullar dikkate alınarak yapılmıştır (226, 227). Tablo 3.2.'de verilen kromatografik yöntem koşulları çözünürlük, in-vitro çözünme hızı, formülasyonların yükleme etkinliği ve stabilite çalışmalarında etkin madde miktarının tayininde kullanılmıştır. Bu analitik yöntemin validasyon çalışmaları için aşağıdaki parametreler değerlendirilmiştir.

- Doğrusallık (Doğrusal Aralık) (Linearity)
- Duyarlılık (Sensitivity)
- Doğruluk (Accuracy)
- Kesinlik (Precision)
 - Tekrarlanabilirlik (Tekrar Edilebilirlik) (Repeatability)
 - Ara Kesinlik (Orta Kesinlik) (Intermediate Precision)
 - Tekrar Elde Edilebilirlik (Reproducibility)

- Dayanıklılık (Stability)

- Özgünlük (Özgüllük, Seçicilik) (Specifity, Selectivty)

Doğrusallık

Doğrusallık, seçilen konsantrasyon aralığında artan konsantrasyon ile orantılı olarak artan etkin madde pik alanları arasındaki ilişkinin doğrusal olup olmadığının değerlendirilmesi amacıyla kullanılan bir parametredir (226, 227). Bu amaçla, etkin maddenin mobil faz bileşimi içinde 100 µg/mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözeltilerden hareketle ve mobil faz ile yapılan seyreltmeler sonucunda 0,78, 1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25 ve 50 µg/mL konsantrasyonlarındaki standart çözeltiler hazırlanmış ve HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen pik alanları ve bunlara karşılık gelen konsantrasyonlardan hareketle doğru denklemleri ve determinasyon katsayıları (R^2) hesaplanarak denklemin doğrusallığı incelenmiştir. Determinasyon katsayısının 1'e yakın olmasına göre geliştirilen yöntemin doğrusallığı değerlendirilmiştir.

Duyarlılık

Analiz yönteminin duyarlılığının belirlenmesine yönelik saptanabilirlik (limit of detection-LOD) ve tayin edilebilirlik sınırlarının (limit of quantification-LOQ) incelenmesi esasına dayanan bir parametredir. LOD değeri bir analitik yöntemin saptayabileceği en küçük konsantrasyonu ifade ederken, LOQ değeri ise kantitatif olarak kabul edilebilir doğruluk ve tekrarlanabilirlikte yöntemin analiz edebileceği en küçük konsantrasyonu ifade etmektedir. LOD değeri, sinyal:gürültü oranının 3:1 olduğu konsantrasyon iken, LOQ değeri sinyal:gürültü oranının 10:1 olduğu konsantrasyondur (226, 227).

Doğruluk

Kullanılan analitik yöntem ile elde edilen bulguların gerçek değerlere yakınlığının gösterilmesi amacıyla kullanılan bir parametredir (226, 227). Düşük (kalibrasyonun düşük noktası, 0,78 µg/mL), orta (kalibrasyonun orta noktası, 6,25 µg/mL) ve yüksek (kalibrasyonun en yüksek noktası, 50 µg/mL) düzeyde üç

konsantrasyon belirlenerek her konsantrasyon noktası için 6 tane standart hazırlanmıştır. Standartların HPLC analizi ile elde edilen sonuçlarının gerçek değerlere yakınlıkları Eşitlik 3.1.'e göre hesaplanıp % varyasyon katsayısı (%VK) ve % geri kazanım olarak ifade edilmiştir.

$$\% \text{ Geri Kazanım} = (A-B) / B \times 100 \quad (3.1.)$$

A: Tayin edilen konsantrasyon, B: Gerçek konsantrasyon

Kesinlik

Kesinlik, bir yöntemin birbirini izleyen ölçümleri arasındaki yakınlığının derecesini ifade etmektedir. Yani spesifik analiz koşulları altında elde edilen bağımsız analitik sonuçlar arasındaki uyumun derecesidir (226, 227).

- **Tekrarlanabilirlik**

Düşük (0,78 µg/mL), orta (6,25 µg/mL) ve yüksek (50 µg/mL) düzeyde belirlenen üç konsantrasyon noktası için hazırlanan 6 standarttan hareketle, aynı laboratuvar ve aynı cihaz kullanılarak gerçekleştirilen tekrarlı ölçümlerle uyum ve uygunluk incelenerek tekrarlanabilirlik parametresi test edilmiştir. Elde edilen bulgulardan hareketle ortalama, SS ve %VK değerleri hesaplanmıştır. HPLC analizi sonrası elde edilen sonuçlar, %VK'nın %2'den küçük olma durumuna göre değerlendirilmiştir.

- **Ara Kesinlik**

M3 için geliştirilen yöntemin ara kesinlik çalışmaları için yine düşük (0,78 µg/mL), orta (6,25 µg/mL) ve yüksek (50 µg/mL) olarak belirlenmiş üç düzeyde her konsantrasyon noktası için 3 farklı günde 3 standart hazırlanmıştır. Hazırlanan standartların HPLC analizleri yapılmış ve elde edilen bulgulardan hareketle ortalama, SS ve %VK değerleri hesaplanmıştır. Analiz sonrası elde edilen sonuçlar, %VK'nın %2'den küçük olma durumuna göre değerlendirilmiştir.

- **Tekrar Elde Edilebilirlik**

Tekrar elde edilebilirlik, kullanılan analitik yöntemin farklı analistler tarafından aynı gün içerisinde güvenilirliğinin kanıtlanması esasına dayanmaktadır. Bu sebeple hazırlanan stok çözeltilerden hareketle aynı konsantrasyonlarda (0,78, 6,25 ve 50 µg/mL) 6 farklı çözelti hazırlanarak analiz edilmiştir ve elde edilen bulgulardan hareketle ortalama, SS ve %VK değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar, %VK'nın %2'den küçük olma durumuna göre değerlendirilmiştir.

Dayanıklılık

Analiz süresince kullanılan etkin maddenin dayanıklı olup olmadığının saptanabilmesi için yapılan bir validasyon ölçütüdür (226, 227). Bu amaçla, etkin maddenin düşük (0,78 µg/mL), orta (6,25 µg/mL) ve yüksek (50 µg/mL) düzeyde belirlenen üç konsantrasyonda çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler 25°C'de 0, 4, 12, 24 saat ve +4°C'de 24 saat bekletilmiştir. Çözeltilerden hazırlandığı anda ve belirlenen sürelerin sonunda alınan örnekler analiz edilerek konsantrasyondaki değişim incelenmiştir. HPLC analizi ile elde edilen sonuçların değerlendirmesi %VK'nın %2'den küçük olma durumuna göre yapılmıştır.

Özgüllük

Geliştirilen yöntemin analiti, örnek içinde bulunabilecek diğer maddelerin varlığında (safsızlık, parçalanma ya da bozunma ürünleri gibi) ayırt edebilme ve doğru bir şekilde ölçebilme yeteneğinin derecesini gösteren bir parametredir (226, 227). Yöntemin özgünlüğünü test etmek amacıyla aynı dalga boyunda (241 nm) M3'ün, çözünme ortamının ve formülasyonda kullanılan yardımcı maddelerin ayrı ayrı HPLC analizleri yapılarak elde edilen kromatogramlar karşılaştırılmıştır.

3.2.5. Nanokristal Formülasyonu Hazırlanmasında Kullanılacak Yöntem ve Formülasyon Bileşenlerinin Belirlenmesi

Bu tez kapsamında formüle edilmek üzere seçilen etkin madde olan M3'ün suda çözünürlük sorunu olduğu için öncelikle çözünürlüğünü artırmak amacıyla uygun bir teknoloji olan NKT ile nanosüspansiyonları hazırlanmıştır. M3 nanosüspansiyonlarının hazırlanmasında aşağıdan yukarıya (bottom-up), yukarıdan

aşağıya (top-down) ve bu yöntemlerin kombinasyonu olan bir kombine yöntem kullanılmıştır. Aşağıdan yukarıya yöntemi çöktürme tekniği, top-down yöntemi ise ultrasonikasyon tekniğinden oluşmaktadır.

M3 Nanokristallerinin Hazırlanmasında Kullanılacak Yöntem Parametrelerine İlişkin Önformülasyon Çalışmaları

M3'ün yeni sentezlenmiş bir molekül olması en uygun stabilizan/stabilizan oranı ve en uygun kriyoprotektan/kriyoprotektan oranının belirlenmesi çalışmalarından önce, seçilen hazırlama yöntemleri için değişen yöntem koşullarına karşı formülasyon çıktılarının değerlendirilmesi gerekliliğini doğurmuştur. Bu amaçla, öncelikle PVA ile değişen yöntem koşullarına karşı formülasyon çıktılarının hangi yönde değiştiği değerlendirilmiştir. Farklı yöntem koşulları kullanılarak hazırlanan PVA-M3 nanokristal formülasyonlarına ait formülasyon parametreleri Tablo 3.3.'de verilmiştir. Aynı stabilizan kullanılarak farklı yöntem koşulları ile hazırlanan formülasyon çıktılarında yola çıkarak en iyi yöntem kombinasyonu belirlenmiştir.

Tablo 3.3. Farklı yöntem koşulları kullanılarak hazırlanan PVA-M3 nanokristal formülasyonlarına ait formülasyon parametreleri.

Formülasyon	Stabilizan Yüzdesi (%)	Karıştırma Hızı (rpm)	Karıştırma Süresi (dak.)	Çöktürme Sıcaklığı (°C)	Sonikasyon Gücü (W)	Sonikasyon Süresi (dak.)	Konsantrasyon (µg/mL)
F1	0,1	800	2,5	10 °C ↓	200	2,5	1,25
F2	0,1	400	2,5	10 °C ↓	200	2,5	1,25
F3	0,1	800	5	10 °C ↓	200	2,5	1,25
F4	0,1	800	2,5	35 °C	200	2,5	1,25
F5	0,1	800	2,5	10 °C ↓	100	2,5	1,25
F6	0,1	800	2,5	10 °C ↓	200	5	1,25
F7	0,1	800	2,5	10 °C ↓	200	2,5	0,5
F8	0,5	800	2,5	10 °C ↓	200	2,5	1,25

PVA-M3 Nanokristal Formülasyonlarının Hazırlanması

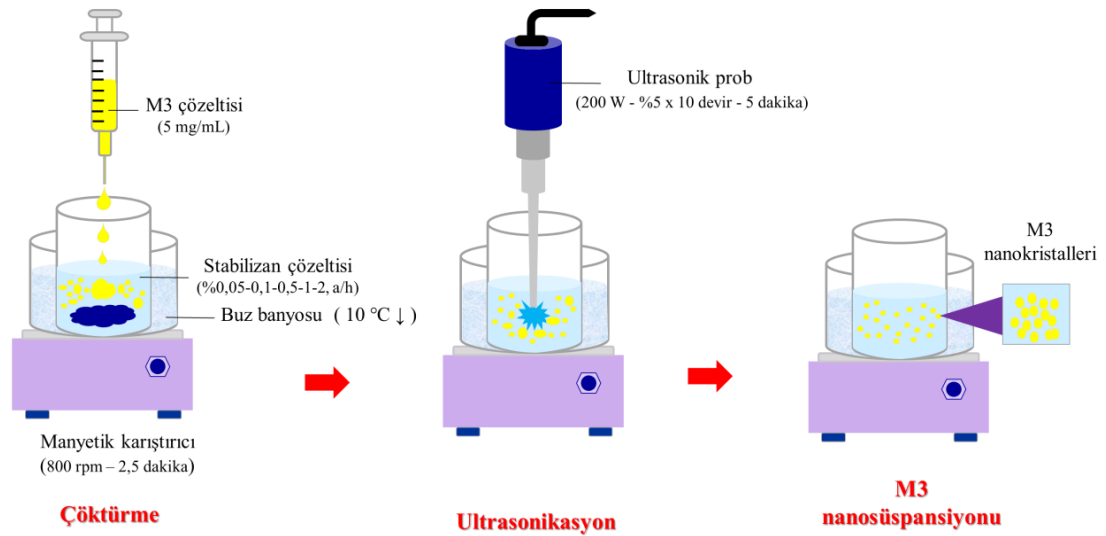
Stabilizan olarak PVA'nın kullanıldığı M3 nanokristal formülasyonlarını hazırlamak üzere F7 haricindeki her bir formülasyon için aseton: PEG 200 (1:1, h/h) çözücü karışımı kullanılarak 5 mg/mL konsantrasyonunda M3 çözeltisi hazırlanmıştır. Amber renkli cam şişelerde hazırlanan karışım 1 saatlik karışma süresinden sonra 0,45 µm por açıklığına sahip politetrafloretillen (PTFE) şırınga filtreden süzülerek sarı renkli berrak ilaç çözeltisi elde edilmiştir (Çözücü fazı). Ardından F8 haricindeki her bir formülasyon için distile su kullanılarak hazırlanan %0,1'lik PVA çözeltisi 0,45 µm por açıklığına sahip CA şırınga filtreden süzülerek stabilizan çözeltisi hazırlanmıştır (Anti-çözücü fazı). Hazırlanan 9 mL anti-çözücü fazı farklı sıcaklıklarda (10°C'nin altında-35°C) ve farklı karıştırma hızlarında (400-800 rpm) karıştırken 1 mL çözücü fazı hızlı bir şekilde anti-çözücü fazına ilave edilmiştir. Farklı karıştırma sürelerinde (2,5-5 dak.) karışan nihai karışım farklı sonikasyon gücü (100-200 W, %5x10 devir) ve sonikasyon sürelerinde (2,5-5 dak.) "*ultrasonik prob*" kullanılarak sonike edildikten sonra santrifüj tüplerine aktararak 13500 rpm'de 20 dak. santrifüj edilmiştir. Ultrasantrifüj işlemi sonrası süpernatant dekante edilerek çökelek 4 mL %0,1 PVA çözeltisinde dağıtılmıştır. F7 için çözücü fazı olarak 2 mg/mL'lik M3 çözeltisi ve F8 için anti-çözücü faz olarak %0,5'lik PVA çözeltisi kullanılarak aynı hazırlama tekniği ile PVA-M3 nanokristal formülasyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan nanosüspansiyonların partikül büyüklüğü, "*Malvern Zetasizer NanoZS*" cihazı kullanılarak ölçülmüştür (n=3). Tüm formülasyon denemeleri M3'ün gün ışığından etkilenmesi nedeni ile karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

Farklı Stabilizan Türü ve Oranları Kullanılarak M3 Nanokristal Formülasyonlarının Hazırlanması

Stabilizan olarak PVA'nın kullanıldığı önformülasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar dikkate alınarak belirlenen yöntem koşulları ile daha ileri formülasyon çalışmaları için farklı stabilizan türü ve oranları kullanılarak denemeler yapılmıştır. Bu amaçla PVA, PVP K30, SoluPlus® gibi polimerik stabilizanlar ve poloksamer 188, poloksamer 407, SDC ve SLS gibi yüzey aktif madde özelliğindeki stabilizanlar %0,05-0,1-0,5-1-2 (a/h) oranlarında

kullanılmıştır. Çöktürme ve ultrasonikasyon yöntemlerinin kombinasyonu ile M3 nanokristal formülasyonları aşağıdaki şekilde hazırlanmış olup M3 nanosüspansiyonlarının hazırlanma tekniği Şekil 3.3.'de şematik olarak özetlenmiştir.

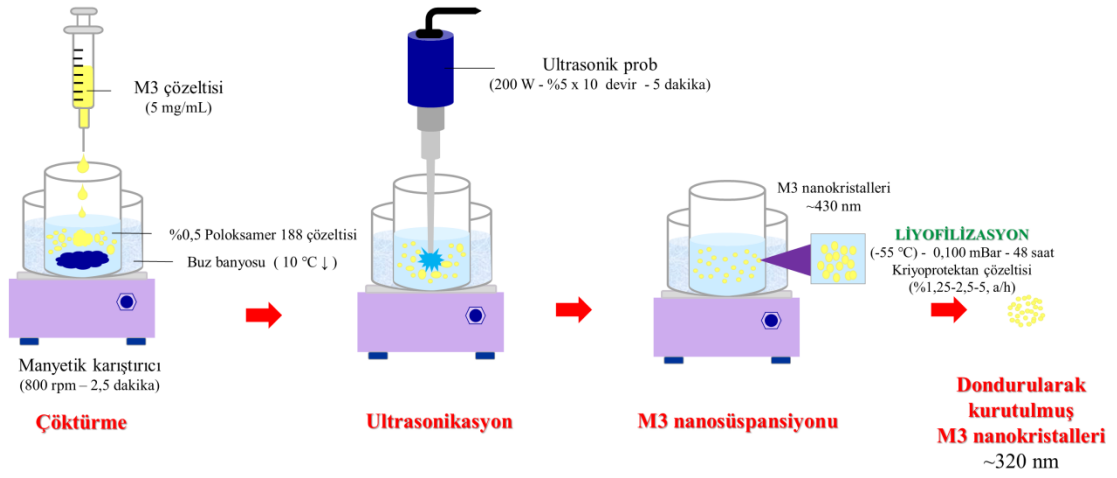
Her bir formülasyon için amber renkli cam şişelerde aseton: PEG 200 (1:1, h/h) çözücü karışımı kullanılarak 5 mg/mL konsantrasyonunda M3 çözeltisi hazırlanmıştır. Karışım 1 saatlik karışma süresinden sonra 0,45 µm por açıklığına sahip PTFE şırınga filtreden süzülerek sarı renkli berrak ilaç çözeltisi elde edilmiştir (Çözücü fazı). Ardından her bir formülasyon için distile su kullanılarak farklı stabilizan türü ve oranlarında (%0,05-0,1-0,5-1-2, a/h) stabilizan çözeltileri hazırlanmış ve 0,45 µm por açıklığına sahip CA şırınga filtreden süzülmüştür (Anti-çözücü fazı). Hazırlanan 9 mL anti-çözücü fazı, (çözelti sıcaklığı 10°C'nin altında tutularak) 800 rpm'de bir manyetik karıştırıcı üzerinde karıştırken, 1 mL çözücü fazı hızlı bir şekilde anti-çözücü fazına ilave edilmiştir. 2,5 dak. karıştırma ile elde edilen nihai karışım “*ultrasonik prob*” kullanılarak 200 W (%5x10 devir) sonikasyon gücünde 5 dak. sonike edilmiştir. Sonikasyon işlemi sonrası içerik santrifüj tüplerine aktararak 13500 rpm'de 20 dak. santrifüj edilmiş ve süpernatant dekante edilerek çökelek 4 mL kullanılan stabilizan çözeltisinde dağıtılmıştır. Hazırlanan nanosüspansiyonların partikül büyüklüğü, “*Malvern Zetasizer NanoZS*” cihazı kullanılarak 3 tekrarlı olacak şekilde ölçülmüştür. Tüm formülasyon çalışmaları M3'ün gün ışığından etkilenmesi nedeni ile karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. M3 nanosüspansiyonlarının hazırlanmasının şematik gösterimi.

Farklı Kriyoprotektan Türü ve Oranları Kullanılarak M3 Nanokristal Formülasyonlarının Kurutulması

Farklı stabilizan türü ve oranları kullanılarak hazırlanan nanosüspansiyon formülasyon çıktıları değerlendirilmiş olup optimum formülasyon olarak %0,5 poloksamer 188 ile hazırlanan M3 nanokristal formülasyonu (M3-NS) seçilmiştir. Farklı kriyoprotektan türü ve oranları için optimum formülasyon ve distile su kullanılarak farklı tür (mannitol, trehaloz, sükröz, dekstran ve dekstroz) ve oranlarda (%1,25-2,5-5) hazırlanan kriyoprotektan çözeltileri 1:1 (h/h) oranında karıştırıldıktan sonra -20°C 'de 12 saat bekletilerek dondurulmuştur. Katı haldeki donmuş karışım 12 saatin sonunda -55°C sıcaklık ve 0,100 mBar vakum basıncı koşullarında “*liyoofilizatörde*” 48 saat boyunca bekletilerek kurutulmuştur. Kurutulan katı nanokristal formülasyonlarından 4 mg tartılıp, 2 mL distile suda dağıtıldıktan sonra “*Malvern Zetasizer NanoZS*” cihazı kullanılarak 3 tekrarlı olacak şekilde partikül büyüklüğü ölçümü yapılmıştır. Tüm formülasyon çalışmaları M3'ün gün ışığından etkilenmesi nedeni ile karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir. M3 nanokristal formülasyonlarının hazırlanması ve kurutulması Şekil 3.4.'de şematik olarak özetlenmiştir.



Şekil 3.4. M3 nanokristal formülasyonlarının hazırlanması ve kurutulmasının şematik gösterimi.

Fiziksel Karışım-1'in Hazırlanması

Fiziksel karışım-1 (FK-1), M3-NK formülasyon bileşiminde bulunan katı maddelerden M3 ve poloksamer 188'in formülasyonda bulunduğu oranlarda (M3 : poloksamer 188, 1 : 9, a/a) tartılarak homojen bir şekilde karıştırılması sureti ile hazırlanmıştır.

3.2.6. Ağızda Dağılan Film Formülasyonlarının Hazırlanmasında Kullanılacak Yöntem ve Formülasyon Bileşenlerinin Belirlenmesi

Önformülasyon Çalışmaları ile En Uygun Plastikleştiricinin Belirlenmesi

Ağızda dağılan film (ADF) formülasyonlarının hazırlanması için “çözücü dökme yöntemi” seçilmiş olup film yapıcı ajan olarak “pullulan” tercih edilmiştir. Pullulan ile en uyumlu plastikleştirici türünün belirlenmesi amacıyla çeşitli önformülasyon çalışmaları yapılmıştır. Önformülasyon çalışmaları sırasında hazırlanan plasebo film bileşenleri ve oranları Tablo 3.4.'de verilmiştir. Önformülasyon çalışmalarından elde edilen plasebo ADF formülasyonları homojenlik, yayılabilirlik, yapışkanlık ve kalıptan çıkma, esneklik ve sertlik açısından değerlendirilmiş olup en iyi film özelliklerine sahip olan kompozisyon ile ADF formülasyon çalışmalarına devam edilmiştir.

Tablo 3.4. Önformülasyon çalışmalarında kullanılan plasebo film bileşenleri ve oranları.

Bileşen (%)	Madde Fonksiyonu	ADF-1	ADF-2	ADF-3
Pullulan	Film yapıcı ajan	5,6	5,6	5,6
Gliserol	Plastikleştirici	3,3	-	-
Sorbitol	Plastikleştirici	-	3,3	-
Propilen Glikol	Plastikleştirici	-	-	3,3
Aspartam	Tatlandırıcı	0,2	0,2	0,2
FDC Yeşili (damla)	Renklendirici	1	1	1
Distile Su	Çözücü	90,89	90,89	90,89

Bir birim plasebo ADF formülasyonunun hazırlanması için; 2 mg aspartam bir cam şişede 0,6 mL distile suda çözülürken (A), başka bir cam şişede 5,6 mg pullulan ve 3,3 mg plastikleştirici madde 0,31 mL distile suda çözülmüştür (B). A karışımı, 800 rpm’de bir manyetik karıştırıcı üzerinde karışan B karışımı üzerine ilave edilmiş ve oluşan karışıma (C) son olarak 1 damla FDC yeşili (10 µg/mL) eklendikten sonra nihai karışım (D) oda sıcaklığında yaklaşık 10 saat karıştırılmıştır. Homojen bir karışım elde edildikten sonra 0,8 mL viskoz sıvı içerik 2x2 cm² boyutlarındaki kare tekli dozlara bölünmüş plastik kalıplara aktarılmıştır. Kalıplardaki karışımlar etüvde 40°C’de yaklaşık 18-20 saat kadar kurutulmuştur (Bir seri üretim 10 ADF miktarı üzerinden hazırlanmış olup üretim sonunda 9 ADF elde edilmiştir).

M3-NK İçeren Ağızda Dağılan Film Formülasyonlarının Hazırlanması

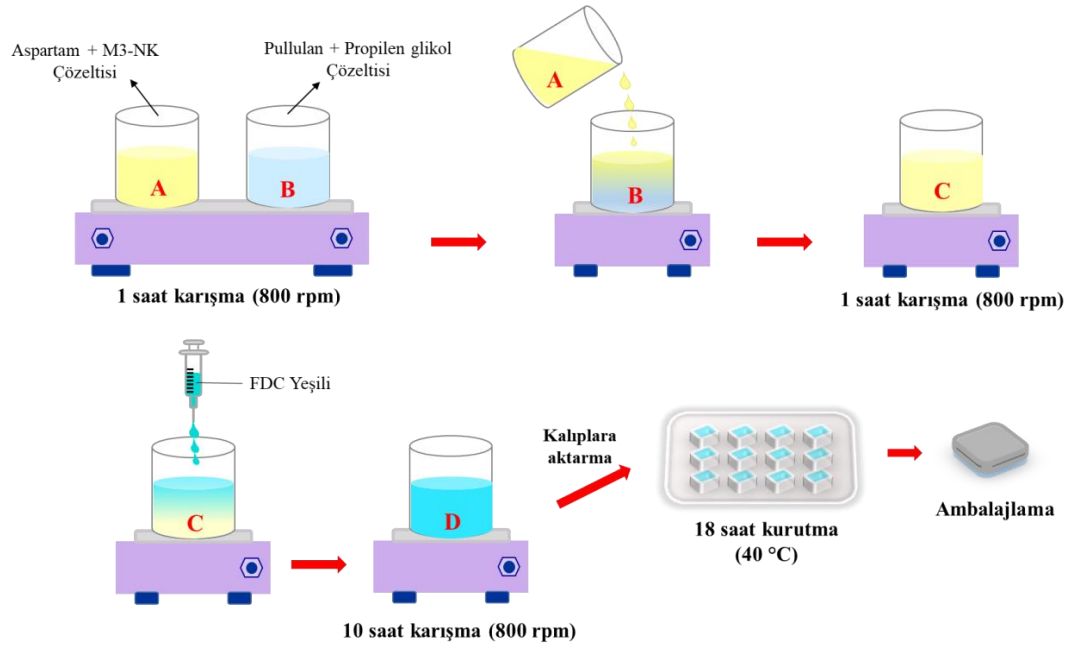
NKT kullanılarak sudaki çözünürlüğü artırılmış optimum M3 nanokristallerinin (M3-NK) ADF formülasyonları “çözücü dökme yöntemine” göre Şekil 3.5.’de özetlendiği gibi hazırlanmıştır. Hazırlanan M3-ADF formülasyon bileşenleri ve oranları Tablo 3.5.’de verilmiştir.

Bir birim M3-NK içeren ADF (M3-ADF) formülasyonu; 0,15 mg M3’e eşdeğer M3-NK tartılarak ve plastikleştirici olarak propilen glikol kullanılarak

Bölüm 3.2.6.'da “Önformülasyon Çalışmaları ile En Uygun Plastikleştiricinin Belirlenmesi” başlığı altında belirtildiği şekilde hazırlanıp 2x2 cm² boyutlarındaki kare tekli dozlara bölünmüş plastik kalıplara aktarılmıştır. Kalıplara aktarılan sıvı film içerikleri Şekil 3.6.'da gösterilmiştir. Kalıplardaki karışımlar etüvde 40°C'de 18 saat kadar kurutulmuştur. Elde edilen kuru filmler M3'ün gün ışığından etkilenmesi ve filmlerin nem çekmesi nedeni ile alüminyum folyodan yapılmış ambalaj materyali kullanılarak paketlenmiştir. Paketleme işlemi için kullanılan alüminyum folyo materyali, ADF'lerin paketlenmesinde kullanılan ambalaj kapatma cihazı, kuruma sonrası elde edilen filmlerin görüntüsü ve ambalajlanmış ADF formülasyonu sırasıyla Şekil 3.7. - Şekil 3.9.'da gösterilmiştir.

Tablo 3.5. M3-NK içeren ADF formülasyon bileşenleri ve oranları.

Bileşen (%)	Kullanım amacı	M3-ADF
M3-NK	Etkin madde	0,15
Pullulan	Film yapıcı ajan	5,6
Propilen Glikol	Plastikleştirici	3,3
Aspartam	Tatlandırıcı	0,2
FDC Yeşili (damla)	Renklendirici	1
Distile Su	Çözücü	90,89



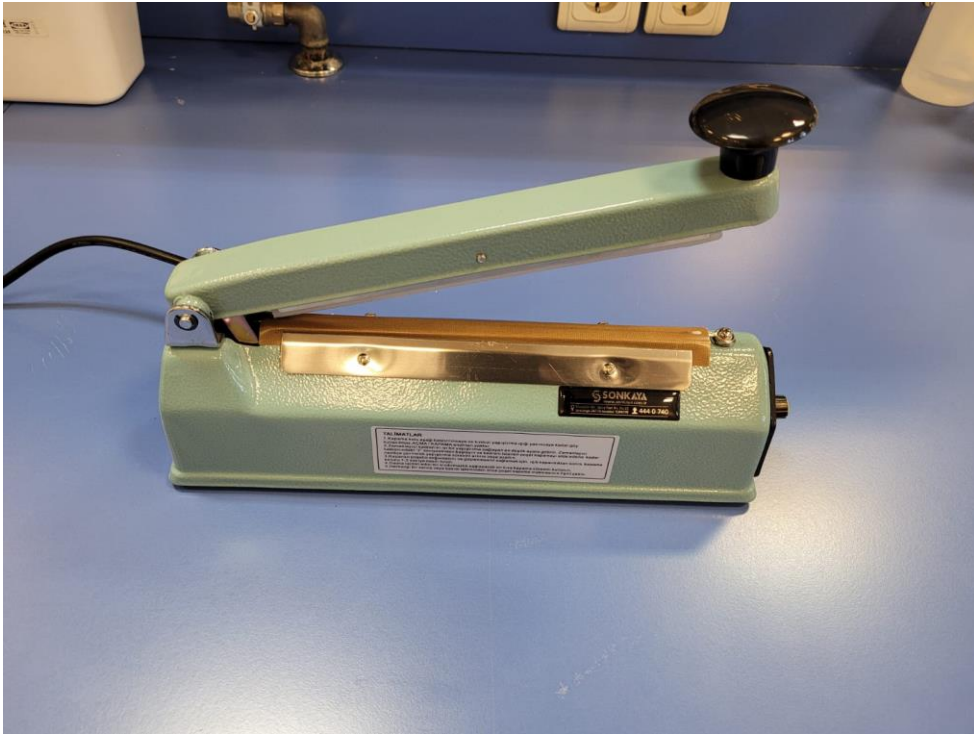
Şekil 3.5. M3-NK içeren ADF (M3-ADF) formülasyonunun hazırlanması.



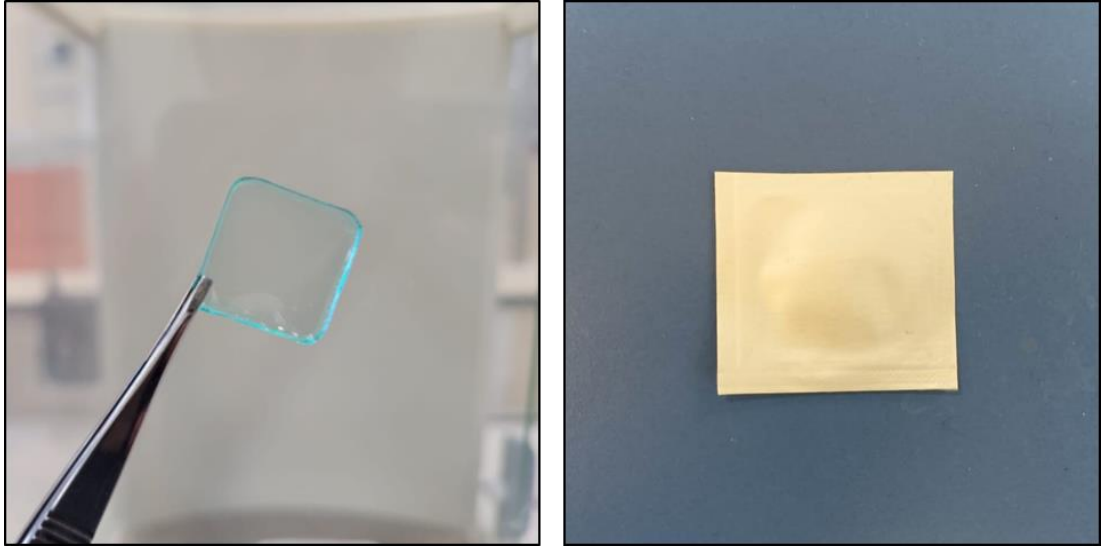
Şekil 3.6. Kalıplara aktarılan sıvı film içeriklerinin görüntüsü.



Şekil 3.7. ADF formülasyonlarının ambalajlanmasında kullanılan materyal (alüminyum folyo).



Şekil 3.8. ADF formülasyonlarının paketlenmesinde kullanılan ambalaj kapatma cihazı.



Şekil 3.9. Kuruma sonrası elde edilen filmlerin görüntüsü ve ambalajlanmış ADF formülasyonu.

Fiziksel Karışım-2'nin Hazırlanması

Fiziksel karışım-2 (FK-2), M3-ADF formülasyon bileşiminde bulunan katı maddelerden M3-NK, pullulan ve aspartamın formülasyonda bulunduğu oranlarda (M3'e eşdeğer M3-NK : pullulan : aspartam, 0,12 : 44,8 : 1,6, a/a/a) tartılarak homojen bir şekilde karıştırılması sureti ile hazırlanmıştır.

3.2.7. M3-NK İçeren Propilen Glikol Bazlı Ağızda Dağılan Filmlerin Karakterizasyonu

Hazırlanan optimum ADF formülasyonları (M3-ADF) üzerinde çeşitli standartlar ve farmakope gerekliliklerine göre kütle tekdüzeliği (ağırlık değişkenliği), kalınlık, yüzey pH'sı, nem tayini, içerik tekdüzeliği, dağılma (petri kabı yöntemi ve damla yöntemi), mekanik kontroller (katlanma direnci (folding endurance), gerilme direnci (tensile strength), % uzama (elongation at break/percent elongation) ve elastik modülüs (Young's modulus) ve in vitro çözünme testi gibi karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Kütle Tekdüzeliği (Ağırlık Değişkenliği) Testi

Kütle tekdüzeliği testi, Avrupa Farmakopesi'nde "*Oromukozal Preparatlar (Oromucosal Preparations)*" bölümünde (Tek Dozluk Preparatlar için Kütle

Tekdüzeliliği, yöntem 2.9.5.) belirtilen koşullara göre yapılmıştır. Bu amaçla rastgele seçilen 20 adet ADF bir terazi yardımı ile tek tek tartılarak ağırlıkları belirlenmiştir (201). Elde edilen sonuçlar ortalama, SS ve %VK olarak verilmiş olup, sonuçların istatistiksel olarak farmakope gerekliliklerine uygunluğu değerlendirilmiştir. Avrupa Farmakopesi'ne göre; ikiden fazla filmin ağırlığı ortalama film ağırlığının Tablo 3.6.'da belirtilen %sapma değerinden fazla olmamalıdır. Ayrıca hiçbir filmin ağırlığının bu %sapma değerinin iki katından fazla olmaması gerekmektedir (201).

Tablo 3.6. Oromukozal preparatların kütle tekdüzeliği için Avrupa Farmakopesi'nde belirtilen kriterler (201).

Ortalama ağırlık	%Sapma
80 mg veya daha az	± 10
80 mg'dan büyük ve 250 mg'dan küçük	± 7,5
250 mg veya daha fazla	± 5

Kalınlık Testi

ADF formülasyonlarının kalınlığı, homojen ve tekdüze bir üretimin yanı sıra doz orantısallığı ve filmin dağılması açısından oldukça önemlidir. Hazırlanan ADF formülasyonlarının kalınlığı, bir “*dijital mikrometre (Mitutoyo Digimatic Micrometer IP65, Japan)*” yardımı ile filmin ortası ve köşe noktaları olmak üzere beş farklı noktadan ölçüm yapılarak belirlenmiştir. Ölçümler 10 adet ADF formülasyonu için gerçekleştirilmiş olup elde edilen bulgular hesaplanan çeşitli istatistiksel parametreler (Ortalama, SS ve %Bağıl standart sapma (%BSS)) ile değerlendirilmiştir (207-209, 211, 228). Ortalama film kalınlığının 5-200 µm arasında olması ve filmlerin kalınlığındaki maksimum değişimin %5'in altında olması gerektiği bildirilmiştir (209, 211, 229).

Yüzey pH Testi

ADF formülasyonlarının kullanım sonrası dağılması ve çözünmesi ile oluşan asidik ya da bazik pH oral mukozayı yakından etkilemektedir. İdeal bir ADF'in yüzey pH'ının nötre yakın olması istenmektedir (214). Hazırlanan ADF formülasyonlarının oral mukoza üzerinde olası tahriş etkilerinin değerlendirilmesi

için yüzey pH'sının ölçülmesi ve belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla 2x2 cm² boyutlarındaki 6 adet ADF'in her biri amber renkli cam şişelerin içerisine yerleştirilerek üzerlerine 5 mL distile su ilave edilmiştir. Ağzuları kapatılan şişeler manyetik karıştırıcı üzerinde 1 saat kadar karıştırıldıktan sonra bir "*pH metre elektrotu*" yardımı ile nihai çözeltilerin pH değerleri ölçülmüştür. Elde edilen bulgular hesaplanan çeşitli istatistiksel parametreler (Ortalama, SS ve %BSS) ile değerlendirilmiştir (208, 230, 231).

Nem Tayini

ADF'lerin nem içeriği formülasyonun stabilitesini etkileyen en önemli parametrelerden biridir. Hazırlanan ADF'lerin nem içeriğinin belirlenmesi amacıyla skalası sıfırlandıktan sonra "*nem tayin cihazına (Ohaus MB45, Switzerland)*" 13 adet ADF (yaklaşık 1 g) yerleştirilmiş ve numune ağırlığı sabitlenene kadar kızılötesi ışıma bileşeni kullanılarak 105°C'de analiz gerçekleştirilmiştir. Su kaybının sabitlendiği andaki %nem miktarı ADF'lerin nem içeriği olarak kaydedilmiştir (198, 207, 211).

İçerik Tekdüzeligi Testi

Doz homojenliğinin sağlanması amacıyla yapılan içerik tekdüzeligi testi, Avrupa Farmakopesi'nde "*Oromukozal Preparatlar (Oromucosal Preparations)*" bölümünde (Tek Dozluk Preparatlar için İçerik Tekdüzeligi, yöntem 2.9.6.) belirtilen koşullar dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla rastgele seçilen 2x2 cm² boyutlarındaki 10 adet ADF'in her biri amber renkli cam şişelerin içerisine yerleştirilerek üzerlerine 10 mL yapay tükürük sıvısı (pH 5,7) ilave edilmiştir. Ağzuları kapatılan şişeler manyetik karıştırıcı üzerinde 1 saat kadar karıştırıldıktan sonra her bir çözelti 0,45 µm por açıklığına sahip CA şırınga filtrelerden süzümüştür. Yapay tükürük sıvısı ile seyreltilen örnekler 241 nm'de valide HPLC miktar tayin yöntemi ile analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlar için çeşitli istatistiksel parametreler (Ortalama, SS ve %BSS) hesaplanmıştır. Ayrıca farmakope gerekliliklerine uygunluğun değerlendirilmesi amacıyla Eşitlik 3.2.'ye göre kabul değeri (KD) de hesaplanıp belirlenmiştir (202).

$$KD=IM-XI +ks$$

(3.2.)

X: Bireysel film içerik tekdüzeliği bulgularının % ortalaması, M: Referans değer, k: Kabul edilebilirlik sabiti (n=10 iken 2,4 olarak alınmaktadır; n: Film sayısı), S: Standart sapma

Eğer, $\% 98,5 < X < \% 101,5$ ise, $M = X$ (KD = ks)

Eğer, $X < \% 98,5$ ise, $M = \% 98,5$ (KD = $98,5 - X + ks$)

Eğer, $X > \% 101,5$ ise, $M = \% 101,5$ (KD = $X - 101,5 + ks$)

ADF formülasyonları üzerinde yapılacak içerik tekdüzeliği çalışmalarında biyolojik ortamı (vücut koşullarını) taklit etmek amacıyla yapay tükürük sıvısı kullanılmıştır. İçerik tekdüzeliği çalışmalarında kullanılan yapay tükürük sıvısı, Na ve ark. (232) tarafından belirtilen tekniğe göre hazırlanmış olup yapay tükürük sıvısı bileşenleri Tablo 3.7.'de verilmiştir. Tablo 3.7.'deki maddeler belirtilen miktarlarda hassas terazide tartıldıktan sonra bir şişeye aktarılarak distile su ile 1 L'ye tamamlanmıştır. Yaklaşık 1 saat bir manyetik karıştırıcı üzerinde karışan çözeltinin pH'sı, 0,1 N HCl çözeltisi ile pH metre kullanılarak 5,7 ye ayarlanmıştır. Nihai çözeltide ortak iyon etkisi ile meydana gelen çökmenin (bulanma) giderilmesi amacıyla çözeltiden 2-3 dak. karbondioksit gazı geçirilmiştir.

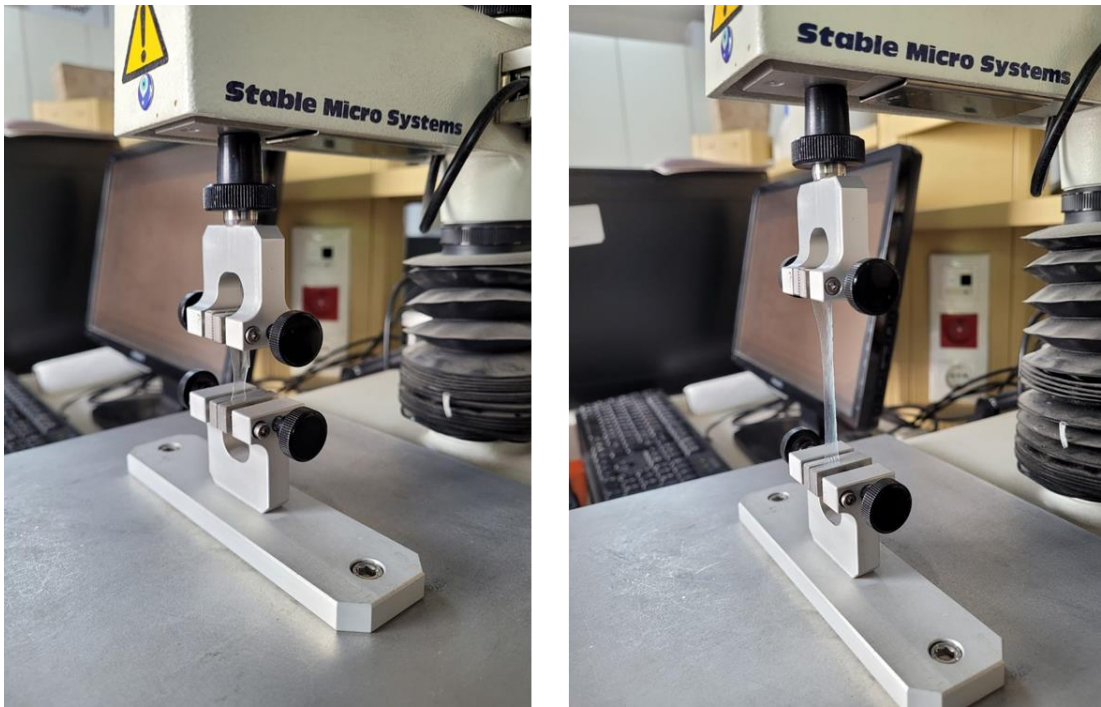
Tablo 3.7. pH 5,7 yapay tükürük sıvısının bileşenleri (232).

Bileşen	Miktar (g)
Sodyum klorür	0,844
Potasyum klorür	1,2
Kalsiyum klorür dihidrat	0,193
Magnezyum klorür heksahidrat	0,111
Potasyum fosfat dibazik	0,342
Distile su km (mL)	1000

Mekanik Kontroller

Hazırlanan ADF formülasyonlarının elastik yapıları ve fiziksel dayanıklılıklarını saptamak amacıyla % uzama (ADF'lerin uzama yüzdesini ifade eden bir parametre) ve elastik modülüs (ADF'lerin sertliğini tanımlayan bir

parametre) değerleri, katlanma (ADF'lerin kırılmalılığının göstergesi olan bir parametre) ve gerilme dirençleri (ADF'in koptuğu noktaya uygulanan maksimum kuvveti ifade eden bir parametre) belirlenerek mekanik özellikleri değerlendirilmiştir. Mekanik testlerin yapılması amacıyla “*Texture Analyzer* (A.XT. Plus Texture Analyzer, Stable Micro Systems, UK)” cihazı kullanılmıştır (şekil 3.10.). 2x1 cm² boyutlarında kesilmiş filmlerin (mekanik analizlerde kullanılan ADF'in kemik şeklinde kesilmesi önerilmektedir) u kısımları cihazın 10 mm aralıklarla tutulan iki kısıkaı arasına yerleştirilmiştir. Filmin kısıkalar arasına sabitlenmesinden sonra üst kısıkaç 0,5 mm/dak. sabit bir hızla çekilerek film gerilmeye başlamış ve filmin kopmuş olduğu noktada cihaz verileri kaydedilmiştir. ADF'in katlanma direnci ise, filmin kırılıncaya kadar aynı yerden katlanmasıyla ölçülmüştür (198, 208, 209, 228). Tüm mekanik ölçümler  ADF formülasyonu üzerinden gerçekleştirilmiştir (n=3).

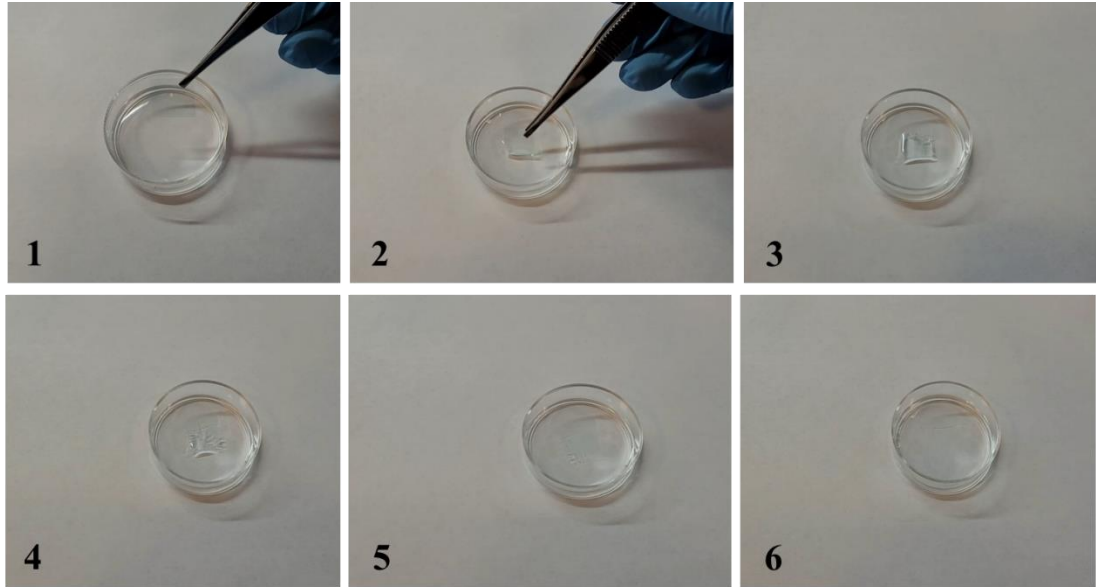


şekil 3.10. ADF formülasyonlarının mekanik kontrollerinde kullanılan cihaz.

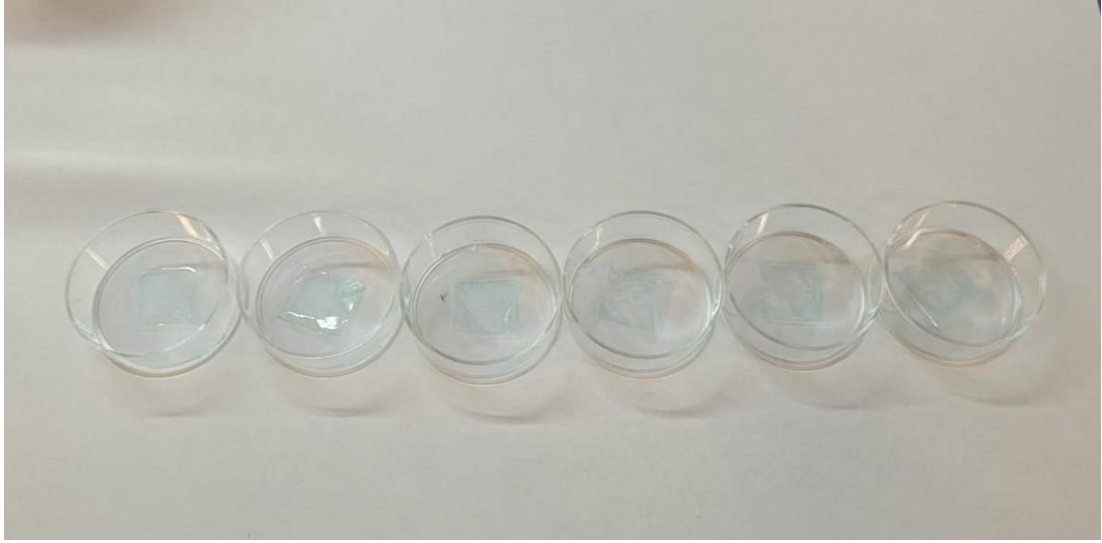
Dağılma Testi

ADF formülasyonlarının dağılma sürelerinin belirlenmesi, literatürde önerildiği gibi “*Petri Kabı Yöntemi (petri dish method)*” ve “*Damla Yöntemi (drop*

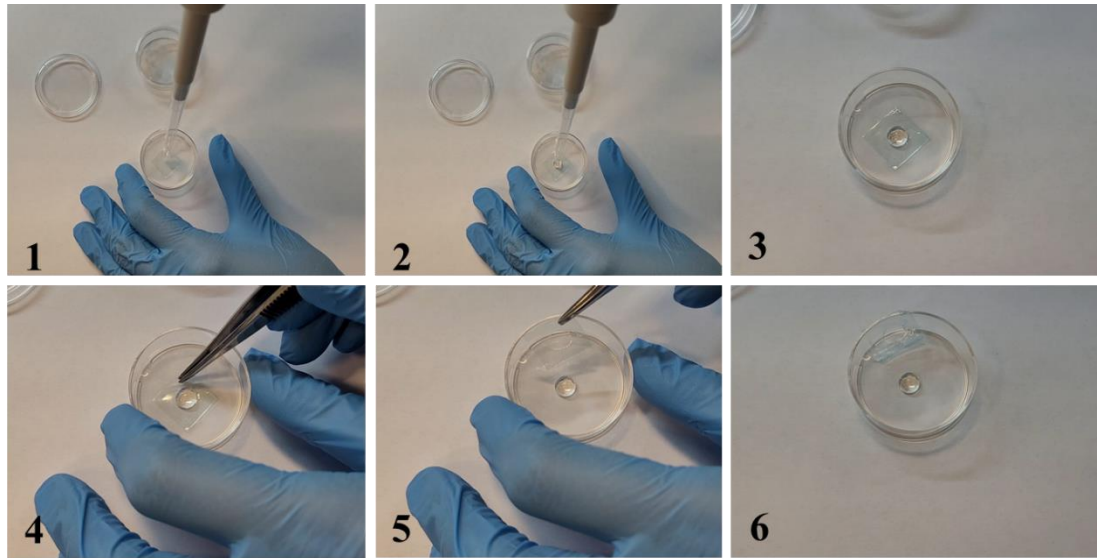
method)” olmak üzere iki farklı yöntem ve distile su (pH 6,4) ile yapay tükürük sıvısı (pH 5,7) olmak üzere iki farklı ortam kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Petri kabı yönteminde Şekil 3.11.’de gösterildiği gibi bir petri kabına 2 mL distile su veya yapay tükürük sıvısı alınıp ortamın yüzeyine bir ADF yerleştirilmiştir. ADF’in dağılmaya başladığı ilk süre ve tamamen kaybolduğu süre kaydedilmiştir. Bu yöntemde ADF’in yerleştirildiği petri kabı çalışma boyunca çalkalanmadan sabit tutulmuştur. Damla yönteminde ise, Şekil 3.12.’de gösterildiği gibi düz bir petri kabına yerleştirilen ADF’in üzerine Şekil 3.13.’de gösterildiği gibi bir mikropipet yardımı ile bir damla distile su veya yapay tükürük sıvısı damlatılmıştır. Damlatılan damlanın zamanla ADF’i çözmesi sonucu ADF’de delik oluşana kadar geçen süre, dağılma süresi olarak kaydedilmiştir. Her iki yöntem ve ortam için 6’şar adet ADF kullanılmış olup (n=6), sonuçlar çeşitli istatistiksel parametrelerin (Ortalama ve SS) hesaplanması ile değerlendirilmiştir (198).



Şekil 3.11. Petri kabı yöntemine göre ADF formülasyonlarının dağılma testi.



Şekil 3.12. Damla yöntemine göre ADF formülasyonlarının petri kaplarına yerleştirilmesi.



Şekil 3.13. Damla yöntemine göre ADF formülasyonlarının dağılma testi.

3.2.8. Stabilite Çalışmaları

ADF formülasyonlarının kısa süreli hızlandırılmış stabilite çalışmaları literatürde önerildiği gibi gerçekleştirilmiş olup, öncelikle hazırlanan M3-ADF'ler ambalaj kapatma cihazı ile tekli paketler halinde paketlenmiştir. Alüminyum paketler içerisindeki M3-ADF formülasyonları 4 hafta boyunca $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $\%75 \pm 5$ nem ile kontrol edilen bir stabilite kabininde saklanmıştır. Periyodik aralıklar (0, 15. ve 30. gün) ile alınan örneklerin morfolojik özellikleri, kütle tekdüzeliği, kalınlık değerleri, yüzey pH'sı, nem tayini, içerik tekdüzeliği ve

dağılma (petri kabı yöntemi ve damla yöntemi) süreleri Bölüm 3.2.7.'de belirtildiği gibi analiz edilerek ADF özellikleri açısından değerlendirilmiştir (233).

3.2.9. Hücre Kültürü Çalışmaları

M3'ün yeni sentezlenen bir molekül olması nedeni ile BCS'deki yerinin tespiti, M3 içeren nanokristal ve ağızda dağılan film formülasyonlarının hücre canlılığı üzerine etkisinin araştırılması ve seçilen optimum formülasyonların etkin maddenin intestinal geçirgenliği (permeabilitesi) üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacıyla çeşitli hücre hatları kullanılarak hücre kültürü çalışmaları yapılmıştır.

Hücre Kültürü Çalışmaları İçin Hücrelerin Çözülmesi ve Çoğaltılması

L929, Caco-2, MCF-7, SK-BR-3 ve A549 hücreleri sıvı azot içinde dondurularak uzun süre saklanabilmektedir. ATCC'den temin edilen ve hücre kültürü çalışmalarına kadar yaklaşık -180°C 'deki azot tankı içinde saklanan donmuş haldeki hücreler deneysel çalışmalarda kullanılacağı zaman azot tankından alınarak 37°C 'deki su banyosunda çözülmüş ve 37°C 'deki kültür ortamına aktarılmıştır. 2000 rpm'de 3-5 dak. santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırılarak çöken hücreler kültür ortamında süspende edilmiş ve kültür kaplarına (flask) aktarılmıştır. 37°C 'de %5 CO_2 içeren bir atmosferde inkübe edilen hücreler konfluent hale (flaskın yüzeyinin %80'ini kapladıklarında) geldiklerinde %0,25 Tripsin ve %0,02 EDTA içeren Tripsin-EDTA çözeltisi yardımıyla flask yüzeyinden kaldırılıp (tripsinizasyon) taze kültür ortamında ATCC'nin önermiş olduğu oranlarda süspende edilmiştir. Hücreler ATCC'de belirtilen protokoller dikkate alınarak pasajlanmıştır.

Hücre kültürü çalışmaları kapsamında kullanılan hücreler %10 (h/h) FBS, 2 mM L-glutamin ve 50 U/mL penisilin-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomisin içeren DMEM (hücre kültür ortamı) kullanılarak 25 cm^2 ve 75 cm^2 flasklarda, 37°C 'de %5 CO_2 içeren inkübatörlerde büyütülmüştür.

İn Vitro Geçirgenlik (Permeabilite) Çalışmaları İçin Caco-2 Hücrelerinin Hazırlanması ve Tek Tabaka Hücre Bütünlüğünün Değerlendirilmesi

Pasaj sayısı 24-36 arasında olan Caco-2 hücre süspansiyonlarındaki hücre sayısı, tripan mavisi kullanılarak inverted mikroskop yardımıyla belirlenmiştir. Canlı hücrelerin sayımı sonrasında hücreler 12 kuyucuklu plakalardaki (ThinCert™, 12 well, por çapı; 1,0 µm) insertlere (1,13 cm²) 6x10⁵ hücre/insert olacak şekilde ekilmiştir. Bu amaçla, apikal kompartmana 0,5 mL hücre süspansiyonu ve bazolateral kompartmana 1 mL kültür ortamı eklenmiştir. Hücreler 21 gün boyunca, gün aşırı kültür ortamları taze kültür ortamı ile değiştirilerek takip edilmiştir. Caco-2 hücrelerinin tek tabaka bütünlüğünün değerlendirilmesi amacıyla 21. günün sonunda kültür ortamındaki membran potansiyeli (boş insert) ve Caco-2 hücrelerinin (hücre içeren insert) transepitel elektrik rezistans (TEER) değerleri bir “*elektrik rezistans sistemi (voltometre)*” kullanılarak ölçülmüştür. TEER değerleri Eşitlik 3.3.’e göre hesaplanmıştır.

$$TEER_{\text{hücre tek tabakası}} = (R_{\text{örnek}} - R_{\text{boş}}) \times A \quad (3.3.)$$

$R_{\text{örnek}}$: hücre içeren insertlerin rezistansı (ohm.cm²), $R_{\text{boş}}$: hücre içermeyen kontrol insertlerin rezistansı (ohm.cm²), A: hücre kültürü insertinin yüzey alanı (cm)

TEER değeri, elektrik rezistans sisteminin (voltometre) elektrotlarının kullanılan kuyucukların apikal ve bazolateral kompartmanlarına yerleştirilerek, bu bölgelerdeki elektriksel akım farkının ölçülmesiyle elde edilen değerdir. TEER değerlerinin ölçülmesi, Caco-2 hücre tek tabakasının bütünlüğünün değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir (234-237).

M3’ün Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi’ndeki Yerinin Tespiti

Caco-2 hücreleri, ilaç geliştirme çalışmalarının erken fazında bağırsaklardan ilaç geçirgenliğinin değerlendirilmesi için yaygın olarak kullanılan hücre kültürü modelidir (238). M3’ün permeabilite çalışmalarında kullanılacak güvenli dozu belirleyebilmek amacıyla öncelikle Caco-2 hücre hattı üzerinde sitotoksikite çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Sitotoksisite çalışmaları için, hücre kültür kabından tripsinizasyon işlemi ile kaldırılan ve hücre kültürü ortamı ile süspande edilen Caco-2 hücreleri (pasaj no: 24), tripan mavisi ile 1:1 oranda seyreltikten sonra hemasitometre yardımıyla inverted mikroskopta sayılmıştır. Canlı hücrelerin sayımı sonrasında hücreler, hücre kültürü ortamı ile tekrar seyreltilerek ekim için gerekli miktarda hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan 100 µL hücre süspansiyonu (5×10^4 hücre/mL) 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir ve hücrelerin hücre kültür kabına tutunmalarını sağlamak amacıyla 16-18 saat inkübe edildikten sonra ortam uzaklaştırılmıştır. Plakalara uygulanacak ilaç çözeltilerinin hazırlanması için, etkin maddenin DMSO’da çözünmesinin ardından kültür ortamı içinde farklı konsantrasyonlardaki dilüsyonları (200, 400, 600, 800, 1000, 1200 µg/mL) yapılmıştır. Ayrıca sitotoksisite çalışmalarında değerlendirilecek her bir örnek için kullanılan DMSO oranlarında DMSO kontrolleri (%0,8 - %1,6 - %2,4 - 3,2 - 4,0 - 4,8) hazırlanmıştır. DMSO kontrollerinin hücre canlılığına etkisinin değerlendirilmesi için ise, kontrol grubu olarak kültür ortamı (DMEM) kullanılmıştır. Hazırlanan örneklerden 100 µL alınarak 96 kuyucuklu plakalara ekildikten sonra plakalar 2 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İkinci saatin sonunda her bir kuyucuğa 25 µL MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromit) (5 mg/mL) çözeltisi ilave edilmiş ve 4 saat boyunca tekrar inkübe edilmiştir. Süre sonunda her bir kuyucuğa 200 µL DMSO ilave edilip “mikroplaka okuyucu (ELISA plate reader, VersaMax, Molecular Devices Co. /ABD)” yardımıyla 570 nm’de kolorimetrik olarak absorbans değerleri okunarak sonuçlar kaydedilmiştir.

M3’ün permeabilite çalışmaları, ABD Sağlık ve İnsan Hizmetleri Departmanı, Gıda ve İlaç İdaresi, İlaç Değerlendirme ve Araştırma Merkezi (CDER) tarafından 2017 yılında yayınlanan kılavuzda belirtilen koşullar dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Bu kılavuza göre, gastrointestinal sistemden bir ilaç maddesinin geçirgenliğini (permeabilitesini) belirlemek için çeşitli yöntemler (a- İnsanda in vivo intestinal perfüzyon çalışmaları, b- Uygun hayvan modelleri kullanılarak in vivo ve in situ intestinal perfüzyon çalışmaları, c)- İnsan veya hayvanlardan alınmış bağırsak dokuları kullanılarak yapılan in vitro geçirgenlik çalışmaları, d- Kültüre edilmiş epitel hücrelerin tekli tabakasında in vitro

geçirgenlik çalışmaları) kullanılabilir. Kılavuzda bir ilaç molekülünün permeabilitesinin belirlenmesi için tek bir yöntemin kullanılmasının yeterli olduğu ancak kesin olarak sonuçların elde edilememesi durumunda ikinci bir yöntemin kullanılmasının da önerildiği belirtilmiştir (239). Ayrıca literatürde bu çalışmalara ilişkin laboratuvarlar arası farklılıklar nedeniyle standart bir protokolün bulunmadığı bildirilmiştir (240). Tüm bu bilgiler ışığında M3'ün BCS'deki yerinin belirlenmesi amacıyla yapılması gereken permeabilite çalışmaları için kılavuzda belirtilen "Kültüre edilmiş epitel hücrelerin tekli tabakasında in vitro geçirgenlik çalışmaları"nın kullanılmasına karar verilmiştir.

M3'ün BCS'deki yerinin tespit edilmesi amacıyla yapılacak olan in vitro permeabilite çalışmaları için Caco-2 hücreleri (pasaj no: 25) yaklaşık 21 gün boyunca uygun koşullarda büyütülmüştür. TEER değerlerinin ölçülmesi ile tek tabaka bütünlüğü değerlendirilmiş ve tek tabaka bütünlüğünün istenilen düzeyde ($TEER > 400 \text{ ohm.cm}^2$) elde edildiği hücreler ile transport çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Transport çalışmalarında, transport ortamı olarak 25 mM D-glukoz ve 10 mM HEPES içeren HBSS kullanılmıştır.

In-vitro permeabilite çalışmalarında kullanılacak ilaç dozu olarak çözünürlük çalışmalarında olduğu gibi kılavuzun önerdiği doğrultuda en yüksek tek terapötik doza sahip olan ticarileşmiş aynı türev etkin maddenin dozunun (Nifedipin'in en yüksek oral terapötik dozu = 90 mg) 250 mL (yaklaşık bir bardak su hacmi)'ye bölünmesiyle elde edilen konsantrasyon değeri (360 $\mu\text{g/mL}$) sitotokisite çalışma bulguları da dikkate alınarak tercih edilmiştir (239).

Transport çalışmalarında ilaç standartları uygulanmadan önce hücreler uygun pH değerlerine sahip transport ortamları ile (Apikal kompartman için; %1,44 DMSO içeren pH 6,0 HBSS (intestinal pH'ı taklit etmesi için) ve bazolateral kompartman için; %1,44 DMSO içeren pH 7,4 HBSS (kan pH'ını taklit etmesi için) 30 dak. boyunca inkübe edilmiştir. Ön inkübasyon sonrası apikal ve bazolateral kompartmanlardaki ortamlar uzaklaştırılmıştır. Daha sonra apikal kompartmanda bulunan hücrelere %1,44 DMSO içeren pH 6,0 HBSS içinde hazırlanan ilaç standartları (360 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonundaki M3 çözeltisi - 0,5 mL) ve bazolateral kompartmana ise aynı oranda DMSO içeren pH 7,4 HBSS çözeltisi (1 mL)

uygulanmıştır. Hücreler 2 saat, 50 rpm ve 37°C'de inkübe edildikten sonra bazolateral kısımdaki ortamlar alınıp valide HPLC miktar tayin yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışmalar 6 tekrarlı gerçekleştirilmiş olup (n=6), Eşitlik 3.4. kullanılarak M3'ün görünür permeabilite katsayısı (P_{app} , cm/s) hesaplanmıştır (198).

$$P_{app} = dC/dt.1/(AC_0) \quad (3.4.)$$

P_{app} = permeabilite katsayısı (cm/s), dC/dt = ilaç permeasyon oranı ($\mu\text{g/s}$), A = insertlerin yüzey alanı (cm^2), C_0 = apikal bölgedeki başlangıç konsantrasyonu ($\mu\text{g/mL}$)

Farklı Stabilizanların M3 Nanosüspansiyon Formülasyonlarının İn Vitro Sitotoksiste Profili Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Yetişkin bir farenin deri altı bağ dokusundan elde edilen L929 hücreleri, sitotoksiste çalışmaları için sıklıkla tercih edilmektedir. NKT ile geliştirilmiş M3 nanosüspansiyonlarında kullanılan stabilizanların (poloksamer 188, poloksamer 407, SDC ve SLS, PVA, PVP K30, SoluPlus®) formülasyonların in vitro sitotoksiste profili üzerine etkisini belirlemek amacıyla, L929 hücre hattı üzerinde 24, 48 ve 72 saat süreyle sitotoksiste çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla öncelikle farklı stabilizan türü ve oranları ile hazırlanan M3 nanosüspansiyonlarının partikül büyüklüğü analizleri yapılmış ve en iyi sonuçların elde edildiği stabilizan oranı (%0,5) ile hazırlanan nanosüspansiyonlar hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır.

Uygun koşullarda büyütülen L929 hücre süspansiyonu (pasaj no: 35) üzerinde yapılan sitotoksiste çalışmaları Bölüm 3.2.9.'da "M3'ün Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi'ndeki Yerinin Tespiti" başlığı altında belirtildiği şekilde 24, 48 ve 72 saat inkübasyon süreleri boyunca gerçekleştirilmiştir. Uygulanan örnekler (M3 ve %0,5 stabilizan ile hazırlanmış M3 nanosüspansiyonları), DMSO'da çözüldükten sonra kültür ortamı içinde farklı konsantrasyonlardaki dilüsyonları (10, 50, 250 $\mu\text{g/mL}$) yapılarak hazırlanmıştır. Sitotoksiste çalışmalarında değerlendirilecek her bir örnek için kullanılan DMSO oranlarında DMSO kontrolleri (%0,05 - %0,25 - %1,25) hazırlanmış ve DMSO kontrollerinin hücre

canlılığına etkisinin değerlendirilmesi için ise, kontrol grubu olarak kültür ortamı (DMEM) kullanılmıştır.

M3 Nanokristal Formülasyonlarının Caco-2, MCF-7, SK-BR-3 ve A549 Hücrelerinin İn Vitro Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin İncelenmesi

Literatürde yapısında DHP halkası taşıyan bileşiklerin çok sayıda farklı farmakolojik özelliklerinin yanında antikanser aktivite sergileyebildikleri ve ilerleyen zamanlarda çeşitli kanser tiplerinin tedavisinde kullanılabileceği bildirilmiştir (10, 241-243). Tez kapsamında kullanılan ve DHP türevi olan M3'ün ve M3 nanokristal formülasyonlarının antikanser etkinliklerinin incelenmesi amacıyla farklı kanser hücre hatları (Caco-2, MCF-7, SK-BR-3 ve A549) üzerinde sitotoksosite çalışmaları yapılmıştır.

Uygun koşullarda büyütülen hücreler (Caco-2; pasaj no: 23, SK-BR-3; pasaj no: 34, MCF-7; pasaj no: 14, A549; pasaj no: 26) üzerinde yapılan sitotoksosite çalışmaları Bölüm 3.2.9.'da "M3'ün Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi'ndeki Yerinin Tespiti" başlığı altında belirtildiği şekilde 24 saat inkübasyon süresi boyunca gerçekleştirilmiştir. Uygulanan örnekler (M3, FK-1, M3-NS, kriyoprotektansız M3-NK ve M3-NK), DMSO'da çözüldükten sonra kültür ortamı içinde farklı konsantrasyonlardaki dilüsyonları (10, 50, 250 µg/mL) yapılarak hazırlanmıştır. Sitotoksosite çalışmalarında değerlendirilecek her bir örnek için kullanılan DMSO oranlarında DMSO kontrolleri (%0,04 - %0,2 - %1,0) hazırlanmış ve DMSO kontrollerinin hücre canlılığına etkisinin değerlendirilmesi için ise kontrol grubu olarak kültür ortamı (DMEM) kullanılmıştır.

Nanokristal ve Ağızda Dağılan Film Formülasyonlarının İn Vitro Geçirgenlik (Permeabilite) Çalışmaları

NKT ile çözünürlük özellikleri iyileştirilen M3 nanokristal ve ağızda dağılan film formülasyonlarının ilacın in-vitro geçirgenliği üzerine etkisi, in-vitro Caco-2 permeabilite çalışmaları ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla, öncelikle permeabilite çalışmalarında kullanılacak uygun ilaç dozunun belirlenebilmesi için sitotoksosite çalışmaları yapılmıştır.

Uygun koşullarda büyütölen Caco-2 (pasaj no: 36) hücreleri üzerinde yapılan sitotoksisite çalışmaları Bölüm 3.2.9.'da "M3'ün Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi'ndeki Yerinin Tespiti" başlığı altında belirtildiği şekilde 2 saat inkübasyon süresi boyunca gerçekleştirilmiştir. Sitotoksisite çalışmalarında kullanılacak bazı örnekler (M3, FK-1, M3-NS, M3-NK, FK-2, plasebo ADF ve M3-ADF) DMSO'da çözüldükten sonra kültür ortamı içinde farklı konsantrasyonlardaki dilüsyonları (37,5, 50, 75, 100, 150, 200 µg/mL) yapılarak ve bazı örnekler (asiklovir (negatif kontrol) ve metaprolol tartarat (pozitif kontrol)) ise kültür ortamında çözüldükten sonra yine kültür ortamı içinde farklı konsantrasyonlardaki dilüsyonları (37,5, 50, 75, 100, 150, 200 µg/mL) yapılarak hazırlanmıştır. Kültür ortamı içinde hazırlanan örnekler için kontrol grubu olarak kültür ortamı (DMEM) kullanılırken DMSO'da hazırlanan örnekler için kontrol grubu olarak DMSO kontrolleri kullanılmıştır. DMSO kontrollerinin hücre canlılığına etkisi ise, kültür ortamına göre değerlendirilmiştir.

İn vitro Caco-2 permeabilite çalışmalarında formülasyonlar uygulanmadan önce, Caco-2 hücreleri (pasaj no: 35) uygun pH değerlerine sahip transport ortamları ile (Apikal kompartman için; %0,8 DMSO içeren pH 6,0 HBSS (intestinal pH'ı taklit etmesi için) ve bazolateral kompartman için; %0,8 DMSO içeren pH 7,4 HBSS (kan pH'ını taklit etmesi için)) 30 dak. boyunca inkübe edilmiştir. Ön inkübasyon işlemi sonrası apikal ve bazolateral kompartmanlardaki ortamlar uzaklaştırılmıştır. Daha sonra apikal kompartmanda bulunan hücelere %0,8 DMSO içeren pH 6,0 HBSS içinde hazırlanan örnekler (200 µg/mL konsantrasyonundaki M3, FK-1, FK-2, M3-NS, M3-NK, M3-ADF, asiklovir (negatif kontrol) ve metaprolol tartarat (pozitif kontrol) - 0,5 mL) ve bazolateral kompartmana ise %0,8 DMSO içeren pH 7,4 HBSS çözeltisi (1 mL) uygulanmıştır. Hücreler 2 saat, 50 rpm ve 37°C'de inkübe edildikten sonra bazolateral kısımdaki ortamlar HPLC miktar tayin yöntemleri ile analiz edilmiştir. Çalışmalar 3 tekrarlı gerçekleştirilmiş olup (n=3), Eşitlik 3.4. kullanılarak örneklerin görünür permeabilite katsayıları (P_{app} , cm/s) hesaplanmıştır (198).

Asiklovir ve Metaprolol Tartarat Tayininde Kullanılan HPLC Miktar Tayin Yöntemleri

Caco-2 in vitro permeabilite çalışmalarında deney prosedürünün sağlıklı ilerleyip ilerlemediğinin incelenebilmesi amacıyla literatür ve kılavuz bilgileri doğrultusunda negatif kontrol olarak asiklovir (düşük permeabilite, absorpsiyon derecesi $< \%50$) ve pozitif kontrol olarak ise metaprolol tartarat (yüksek permeabilite, absorpsiyon derecesi $\geq \%85$) kullanılmıştır (109). Permeabilite çalışmaları sonunda bazolateral kompartmandan alınan asiklovir ve metaprolol tartarat örnekleri Tablo 3.8. ve Tablo 3.9.'daki HPLC yöntem parametrelerine göre analiz edilmiştir (244).

Tablo 3.8. Asiklovir'in miktar tayininde kullanılan HPLC koşulları.

Cihaz	HPLC Agilent 1200 (Almanya)
Mobil Faz (h/h/h)	0,0125 M KH_2PO_4 (pH 7,0) : Metanol (45:55)
Analitik Kolon	Inert Sustain® C18 (4.6x250mm, 5 μm)
Enjeksiyon Hacmi (μL)	20
Akış Hızı (mL/dak.)	1
Dedektör	Diode Array Dedektör (DAD)
Analiz Sıcaklığı ($^{\circ}\text{C}$)	25
Analiz Süresi (dak.)	15
Dalga Boyu (nm)	254

Tablo 3.9. Metoprolol tartarat'ın miktar tayininde kullanılan HPLC koşulları.

Cihaz	HPLC Agilent 1200 (Almanya)
Mobil Faz (h/h/h)	0,0125 M KH ₂ PO ₄ (pH 7,0) : Metanol (45:55)
Analitik Kolon	Inert Sustain® C18 (4.6x250mm, 5µm)
Enjeksiyon Hacmi (µL)	20
Akış Hızı (mL/dak.)	1
Dedektör	Diode Array Dedektör (DAD)
Analiz Sıcaklığı (°C)	25
Analiz Süresi (dak.)	15
Dalga Boyu (nm)	227

3.2.10. İstatistiksel Analizler

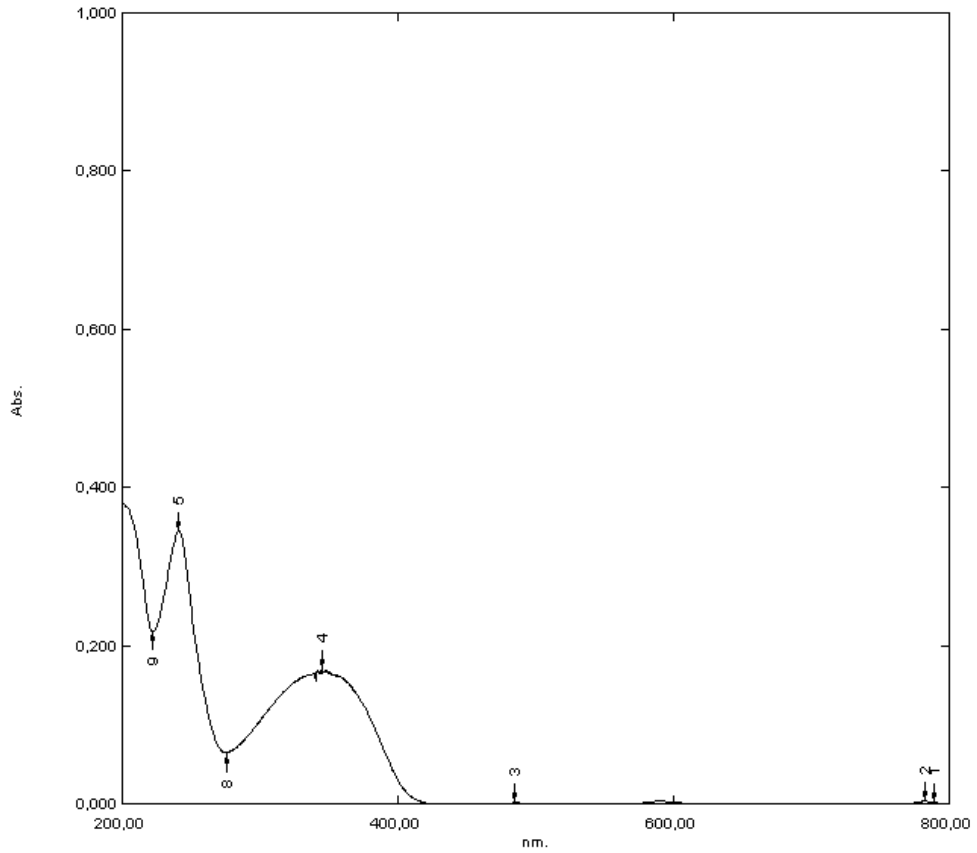
İstatistiksel analizler GraphPad Prism 8.4.2 (GraphPad Software Inc., CA, USA) programı kullanılarak yapılmıştır. İn vitro deneylerden elde edilen bulgular, güven aralığı % 95 olarak kabul edilip student's t testi ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirilmiştir. Belirlenen gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edildiğinde farklılığın hangi örnekler arasında olduğunu belirlemek amacıyla ise, Mann-Whitney U testi veya Tukey yöntemine göre ikili karşılaştırmalar yapılmıştır. Gruplar arasındaki farklılığın önemliliği elde edilen p değerinin yanılma düzeyinden büyük ($p > \alpha$, istatistiksel olarak anlamsız) veya küçük ($p < \alpha$ istatistiksel olarak anlamlı) olmasına göre değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. M3'ün Fizikokimyasal Özelliklerinin Değerlendirilmesi

4.1.1. UV Spektrum Analizi

M3'ün UV spektrum taraması analizi incelendiğinde maksimum pik verdiği dalga boyu 241 nm olarak saptanmıştır (Şekil 4.1.). Bu nedenle tüm analitik yöntem ve validasyon çalışmaları 241 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.1. M3'ün metanol:asetonitril:su (35:40:25, h/h/h) çözücü ortamındaki çözeltisine (6,25 µg/mL) ait UV spektrumu.

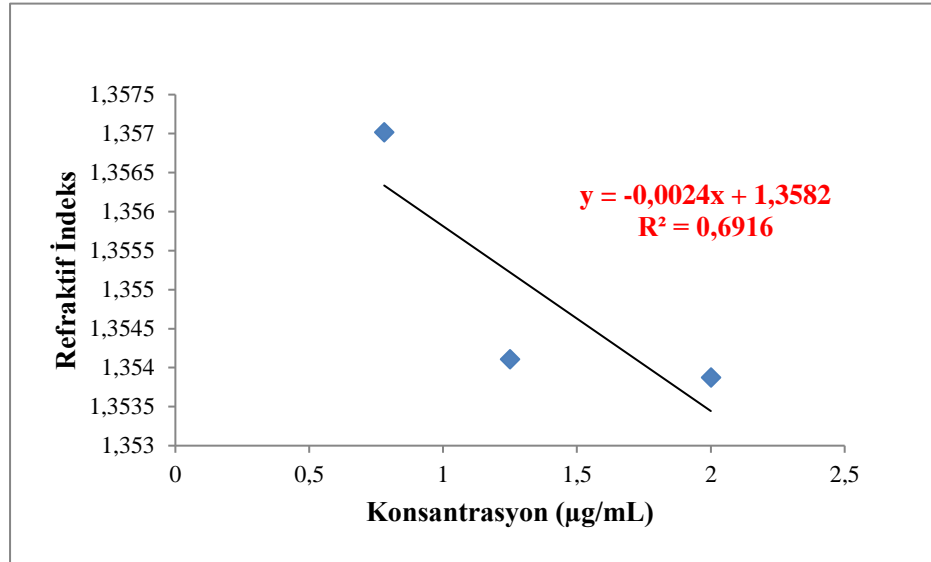
4.1.2. Refraktif İndeks Analizi

M3'ün farklı konsantrasyonlarda saptanan refraktif indeks ölçüm sonuçları Tablo 4.1.'de ve refraktif indeks ölçüm sonuçlarına ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi Şekil 4.2.'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre M3'ün refraktif indeksi 1,3582 olarak saptanmış olup etkin maddenin ve hazırlanan

nanosüspansiyon/nanokristal formülasyonların partikül büyüklüğü analizi çalışmalarında bu değer kullanılmıştır.

Tablo 4.1. M3'ün farklı konsantrasyonlarda saptanan refraktif indeks değerleri (n=3).

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	1.Ölçüm	2. Ölçüm	3.Ölçüm
2	1,35396	1,35382	1,35384
1,25	1,35414	1,35406	1,35412
0,78	1,35736	1,35698	1,35672



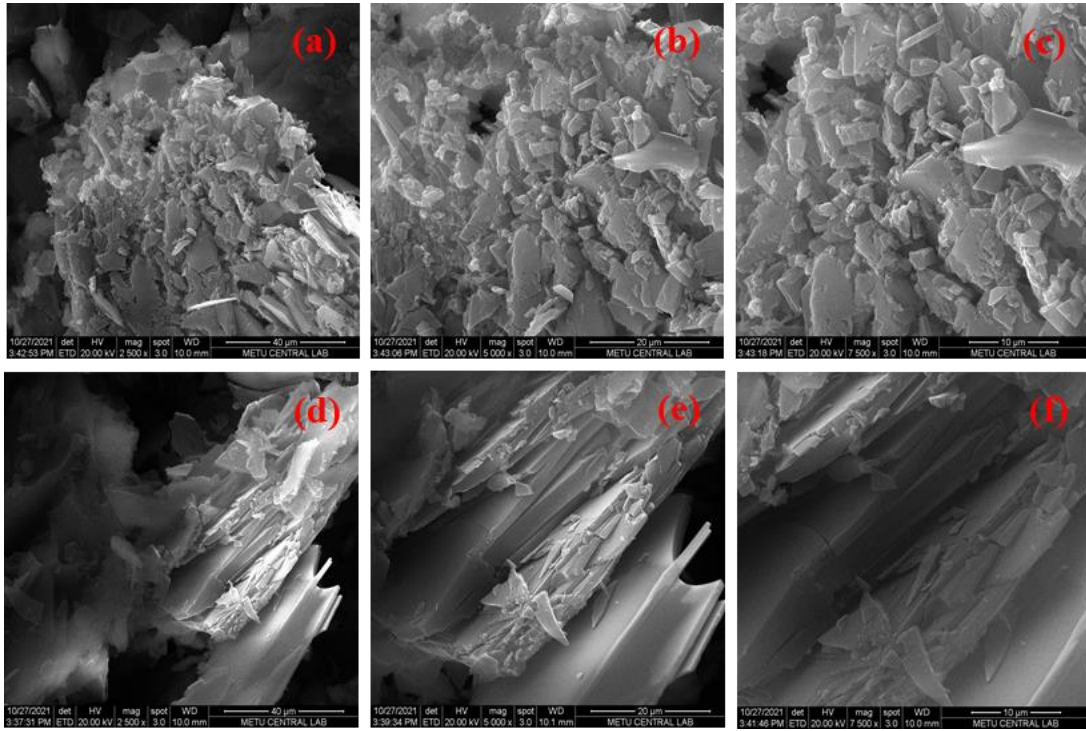
Şekil 4.2. M3'ün aseton çözücü ortamındaki refraktif indeks ölçüm sonuçlarına ait kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Ortalama; n=3).

4.1.3. M3'ün Partikül Büyüklüğü Analizi

M3'ün tekrarlı ölçümler sonrası elde edilen analiz sonuçlarına göre ortalama partikül boyutu d (0,1) için $14,392 \pm 0,583 \mu\text{m}$, d (0,5) için $102,006 \pm 7,518 \mu\text{m}$ ve d (0,9) için $507,993 \pm 64,38 \mu\text{m}$ olarak saptanmıştır (Ortalama \pm SS, n=6).

4.1.4. Taramalı Elektron Mikroskop Analizi

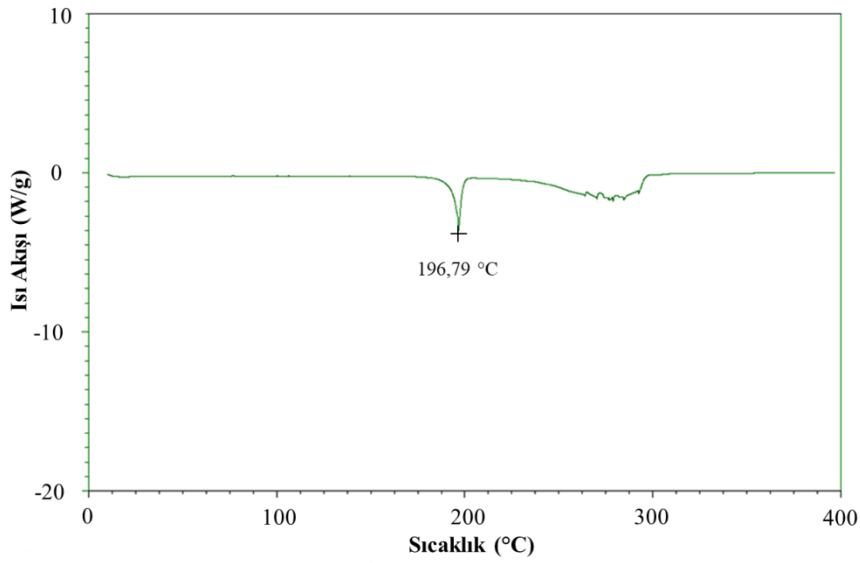
M3'ün SEM analizleri için farklı büyütme oranlarında (2500x, 5000x ve 7500x) görüntülemeler yapılmış olup temelde kristal yapıda M3 partikülleri gözlemlenmiştir (Şekil 4.3.). Ayrıca kaba plaka şeklinde düzensiz kristal şeklindeki partiküllerin varlığı da dikkat çekmiş olup partikül boyutlarının 10 µm ve 100 µm aralığında değiştiği saptanmıştır.



Şekil 4.3. M3'ün farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri (2500x (a, d), 5000x (b, e) ve 7500x (c, f)).

4.1.5. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Analizi

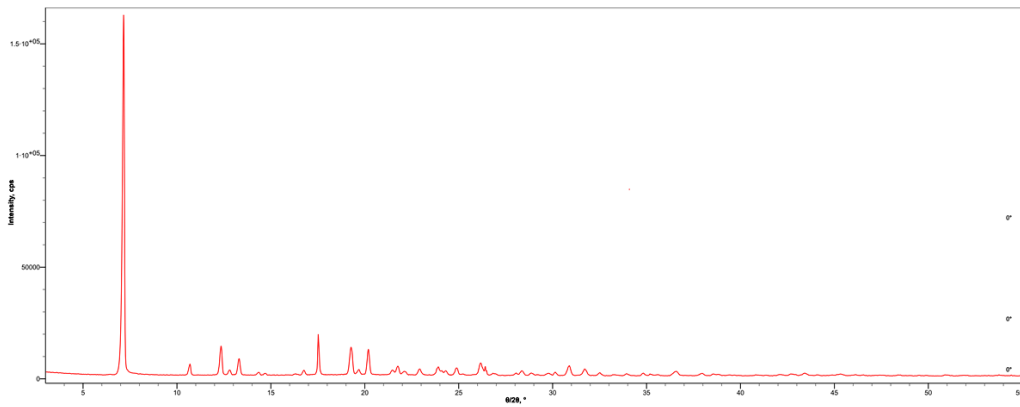
Alüminyum panlar içindeki M3'ün azot atmosferi altında, 10°C/dak. hızda ve 0-400°C sıcaklık aralığında analizi sonucu elde edilen DSC termogramları incelendiğinde erime derecesi 196,79°C olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. M3'e ait DSC termogramı.

4.1.6. X-Işını Kırınımı Analizi

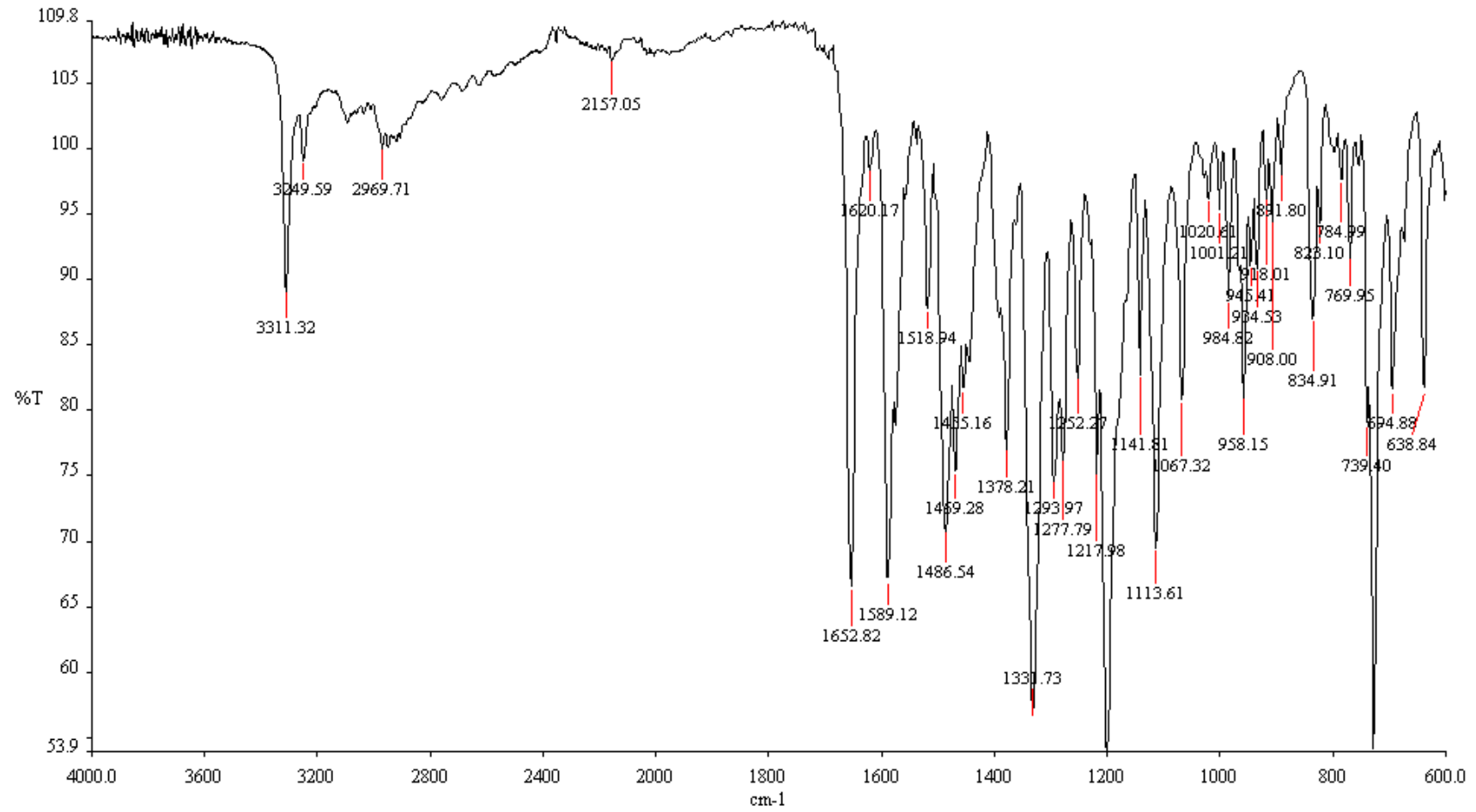
M3'e ait X-ışını kırınımı difraktogramı Şekil 4.5.'de verilmiş olup 7° civarında gözlenen keskin pik M3'ün kristal yapıda bir madde olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.5. M3'e ait X-ışını kırınımı difraktogramı.

4.1.7. Fourier Dönüştümlü Kızılötesi Spektroskopi Analizleri

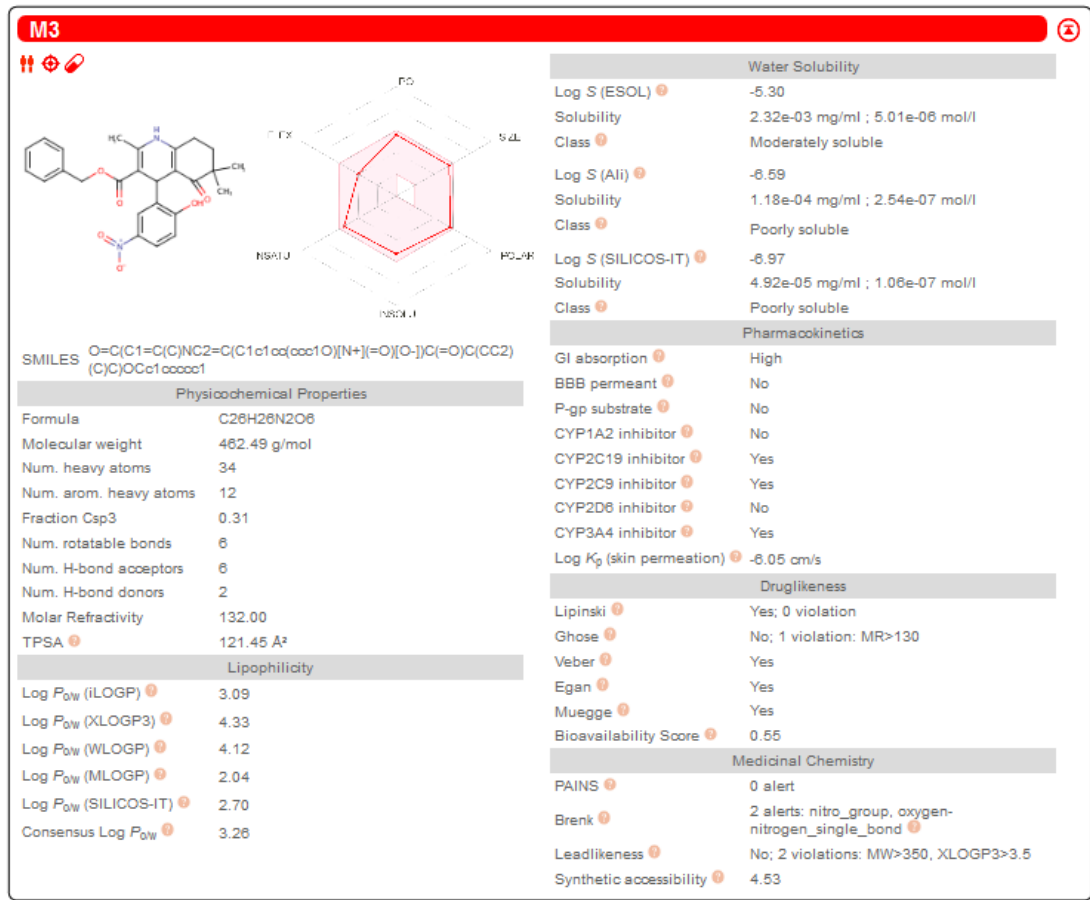
M3'ün FT-IR spektrumu (Şekil 4.6.) incelendiğinde temel olarak DHP halka sisteminde bulunan fonksiyonel gruplara ait gerilim bantlarının pikleri tespit edilmiştir (66, 174). Ayrıca kimyasal yapısına ait grupların pikleri de görülmektedir.



Şekil 4.6. M3'e ait FT-IR spektrumu.

4.2. M3 ve M3 Nanokristal Formülasyonu İçin Yapılan Çözünürlük Çalışma Sonuçları

M3'ün sudaki çözünürlük değerini teorik olarak tahmin edebilmek amacıyla kılavuzda önerilen açık erişimli kaynaklardan <http://www.swissadme.ch/> ile elde edilen sonuçlar Şekil 4.7.'de gösterilmiş olup çözünürlük değerleri; 2,32 µg/mL (ESOL), 0,118 µg/mL (Ali) ve 0,049 µg/mL (SILICOS-IT) olarak hesaplanmıştır.



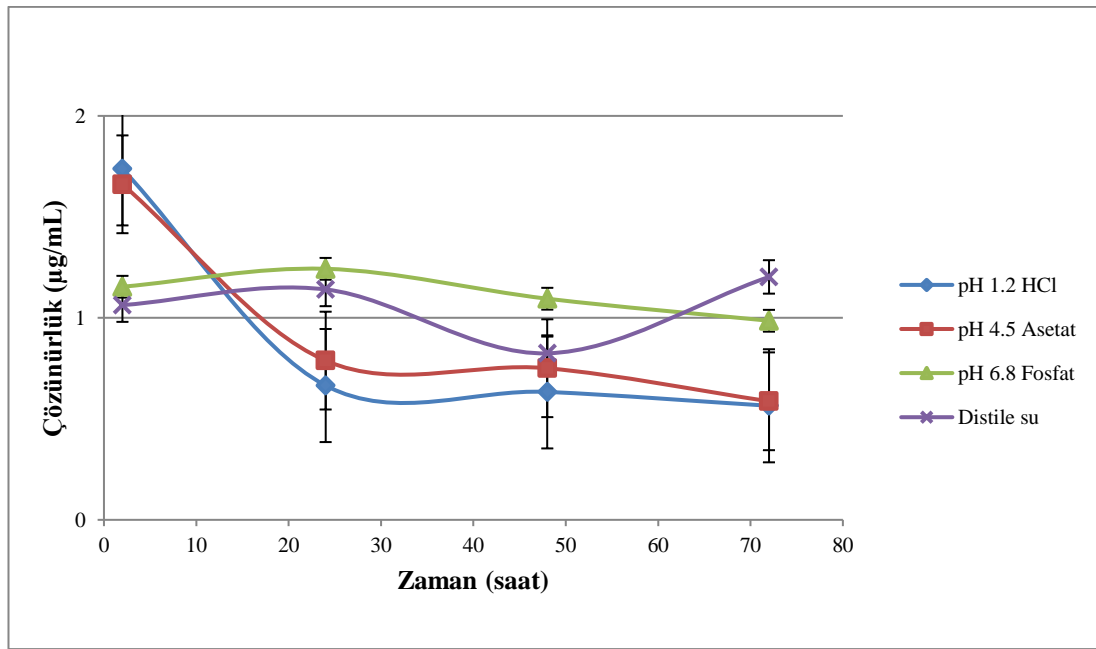
Şekil 4.7. M3'ün sudaki çözünürlük değerine ilişkin teorik tahminlerin sonuçları (<http://www.swissadme.ch/>).

M3'ün farklı ortamlarda (su, pH 1,2 HCl, pH 4,5 Asetat, pH 6,8 Fosfat tamponları) ve farklı bekletme sürelerinde gerçekleştirilen çözünürlük çalışma sonuçları Tablo 4.2. ve çözünürlük profilleri ise Şekil 4.8.'de verilmiştir. Elde edilen çözünürlük profiline göre eğrinin 24, 48 ve 72 saat sonra sabitlendiği görülmektedir.

Bu nedenle M3'ün doygunluk çözünürlüğü 24-48 ve 72 saat sonra elde edilen sonuçların ortalaması alınarak belirlenmiştir.

Tablo 4.2. M3'ün farklı çözünme ortamları ve farklı bekletme sürelerine ait çözünürlük sonuçları (Ortalama \pm SS; n=3).

Zaman (saat)	Çözünürlük ($\mu\text{g/mL}$)							
	pH 1,2 HCl Tamponu		pH 4,5 Asetat Tamponu		pH 6,8 Fosfat Tamponu		Distile su	
	Ortalama	SS	Ortalama	SS	Ortalama	SS	Ortalama	SS
2	1,738	1,128	1,661	1,901	1,154	1,254	1,063	0,945
24	0,665	0,946	0,788	1,183	1,243	1,049	1,141	1,016
48	0,633	0,718	0,751	0,987	1,095	0,910	0,824	1,115
72	0,565	0,778	0,587	0,918	0,986	0,856	1,203	1,088

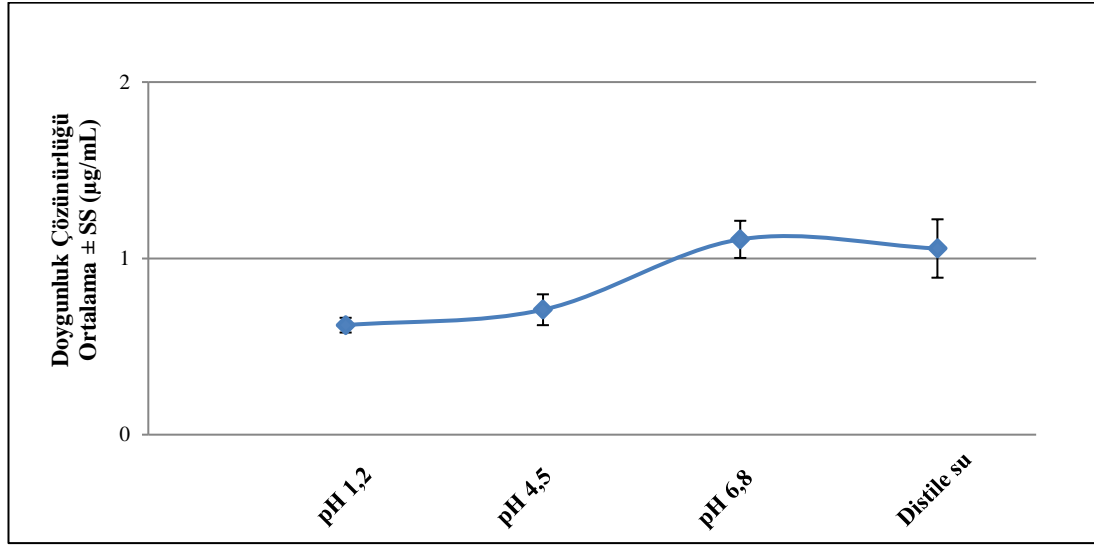


Şekil 4.8. M3'ün farklı çözünme ortamlarındaki çözünürlük profili.

M3'ün farklı ortamlardaki ortalama doygunluk çözünürlük değerleri Tablo 4.3.'de ve farklı çözünme ortamlarındaki doygunluk çözünürlüğü grafiği ise Şekil 4.9.'da verilmiştir. Çözünürlük çalışmaları sonucunda M3'ün doygunluk çözünürlüğü $1,056 \mu\text{g/mL}$ olarak saptanmış olup literatür ile benzer nitelikte olduğu belirlenmiştir (245).

Tablo 4.3. M3'ün farklı çözünme ortamlarındaki çözünürlük sonuçları.

	Çözünürlük ($\mu\text{g/mL}$)			
	pH 1,2 HCl	pH 4,5 Asetat	pH 6,8 Fosfat	Distile su
Ortalama	0,621	0,709	1,108	1,056
SS	0,042	0,087	0,105	0,166

**Şekil 4.9.** M3'ün farklı çözünme ortamlarındaki doğunluk çözünürlüğü (Ortalama \pm SS; n=3).

Farklı ortamlara ait DSV bulguları Tablo 4.4.'de verilmiştir. Yapılan çalışmada kullanılmak üzere aynı halka sistemine (1,4-DHP) sahip ticari etkin maddeler için "FDA Orange Book" aracılığıyla yapılan aramalarda DHP türevleri içinde en yüksek dozların nifedipin için kullanıldığı tespit edilmiştir (246). Nifedipin için (oral yolla alınan ticari ürünler içinde) en yüksek terapötik doz, 90 mg'dır. Yapılan matematiksel hesaplamalar sonucunda aynı türev etkin maddelerden nifedipinin en yüksek terapötik dozu temel alınarak yapılan hesaplamalar DSV'nin her dört ortam için de 250 mL'den büyük olduğunu göstermiştir. Tüm sonuçlar etkin maddenin çözünürlüğünün "DÜŞÜK" olduğunu kanıtlamaktadır.

Tablo 4.4. M3 için farklı ortamlarda hesaplanan DSV değerleri (Ortalama \pm SH; n=3).

DSV (mL)			
pH 1,2 HCl Tamponu	pH 4,5 Asetat Tamponu	pH 6,8 Fosfat Tamponu	Distile su
145600,7 \pm 100,6	129132,3 \pm 131,4	81977,9 \pm 87,8	87631,8 \pm 123,7

M3'ün farklı ortamlarda saptanan çözünürlük değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığı “*Tek Yönlü Varyans Analizi (One Way ANOVA)*” ile test edilmiştir. Farklı grupların belirlenmesi amacıyla ise “*Tukey HSD Yöntemi*” kullanılmıştır. *Tek yönlü varyans analizi* etkin maddenin farklı ortamlardaki çözünürlük değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunduğunu gösterirken *Tukey HSD Yöntemi* bu farkın Su-HCl, HCl-Fosfat ve Asetat-Fosfat ortamları arasında olduğunu, Su-Asetat, Su-Fosfat ve HCl-Asetat ortamları arasında anlamlı bir fark bulunmadığını göstermiştir. İstatistiksel sonuçlar Tablo 4.5. ve Tablo 4.6.’da özetlenmiştir.

Tablo 4.5. Varyans analizi tablosu.

Değişim Kaynağı	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F	p
Genel	0,681	11			
Gruplar Arası	0,537	3	0,179	9,962	<0,05
Grup İçi	0,144	8	0,018		

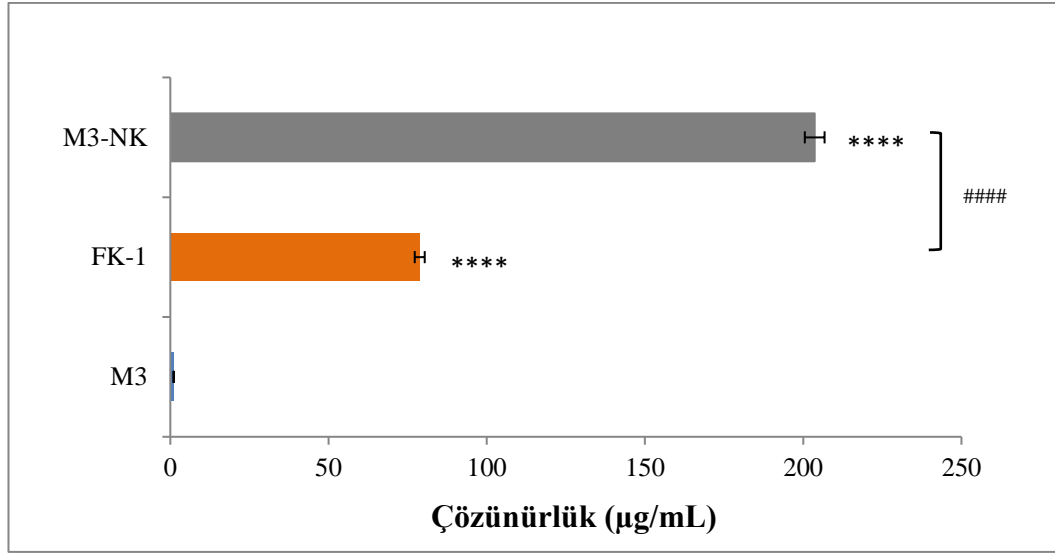
Tablo 4.6. Farklı çözünme ortamlarına ilişkin ikişerli karşılaştırmalar.

Gruplar	Ortalamaların farkı	HSD	Karar
Su-HCl	0,435	0,351	p<0,05
Su-Asetat	0,347	0,351	p>0,05
Su-Fosfat	0,052	0,351	p>0,05
HCl-Asetat	0,088	0,351	p>0,05
HCl-Fosfat	0,487	0,351	p<0,05
Asetat-Fosfat	0,399	0,351	p<0,05

Fiziksel karışım (FK-1) ve dondurularak kurutulmuş nanokristal formülasyonlarının (M3-NK) 24 saat boyunca distile su ortamında gerçekleştirilen çözünürlük çalışma sonuçları Tablo 4.7.'de verilmiş ve çözünürlük profilleri Şekil 4.10.'da gösterilmiştir. M3, FK-1 ve M3-NK için sudaki çözünürlük değerleri sırasıyla 1,055 µg/mL, 78,8 µg/mL ve 203,6 µg/mL olarak saptanmış olup NKT ile M3'ün çözünürlüğünde istatistiksel olarak anlamlı bir artış elde edilmiştir (FK-1 için yaklaşık 80 kat ve M3-NK için yaklaşık 200 kat artış)(p<0,05).

Tablo 4.7. M3, FK-1 ve M3-NK formülasyonunun distile su ortamında yapılan çözünürlük çalışma sonuçları (Ortalama ± SS; n=3).

	Çözünürlük (µg/mL)		
	M3	FK-1	M3-NK
1	1,146	80,693	203,272
2	1,033	76,841	207,619
3	0,986	78,817	199,993
Ortalama	1,055	78,817	203,628
SS	0,067	1,574	3,123



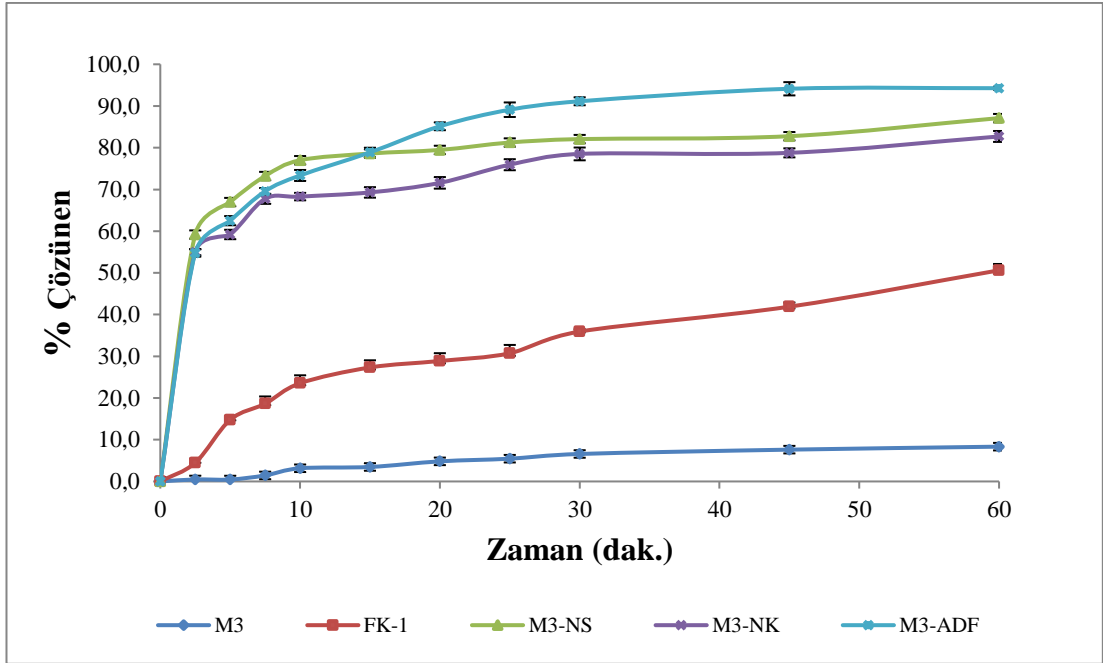
Şekil 4.10. M3, FK-1 ve M3-NK formülasyonunun çözünürlük profilleri (Ortalama \pm SS; n=3)(****p<0,0001, M3 ile karşılaştırıldığında; ####p<0,0001, farklı gruplar karşılaştırıldığında).

4.3. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışmaları

M3 ve optimum formülasyonların 0,01 N HCl ortamında yapılan in vitro çözünme hızı çalışma sonuçları Tablo 4.8.'de ve çözünme hızı profilleri Şekil 4.11.'de verilmiştir.

Tablo 4.8. M3 ve optimum formülasyonların 0,01 N HCl ortamında yapılan in vitro çözünme hızı çalışma sonuçları (%Çözünen, %VK; n=6).

Formülasyon Kodu	Zaman (dak.)	2,5	5	7,5	10	15	20	25	30	45	60
M3	%çözünen	0,47	0,46	1,44	3,16	3,47	4,82	5,45	6,59	7,62	8,34
	%VK	1,62	1,97	1,03	0,84	1,81	1,23	1,46	1,52	1,53	1,31
FK-1	%çözünen	4,49	14,78	18,64	23,54	27,33	28,88	30,73	35,93	41,90	50,62
	%VK	0,94	0,79	1,74	1,91	1,72	1,87	2,00	0,55	0,99	1,52
M3-NS	%çözünen	59,19	66,98	73,22	77,01	78,61	79,48	81,25	82,08	82,76	87,10
	%VK	1,56	1,99	1,05	1,28	1,93	1,99	1,79	1,74	1,85	1,96
M3-NK	%çözünen	54,99	59,21	67,75	68,28	69,29	71,58	75,93	78,52	78,77	82,71
	%VK	1,33	1,91	1,78	1,31	1,81	1,94	1,74	1,95	1,37	1,58
M3-ADF	%çözünen	54,77	62,51	69,56	73,35	78,88	85,14	89,11	91,14	94,14	94,27
	%VK	1,61	1,76	1,13	1,79	1,41	1,10	1,95	1,04	1,69	0,38



Şekil 4.11. M3 ve optimum formülasyonların 0,01 N HCl ortamındaki in vitro çözünme hızı profilleri (Ortalama \pm SS; n=6), (FK-1: Fiziksel karışım-1, M3-NS: optimum nanosüspansiyon formülasyonu, M3-NK: optimum dondurularak kurutulmuş M3 nanokristal formülasyonu, M3-ADF: optimum ADF formülasyonu).

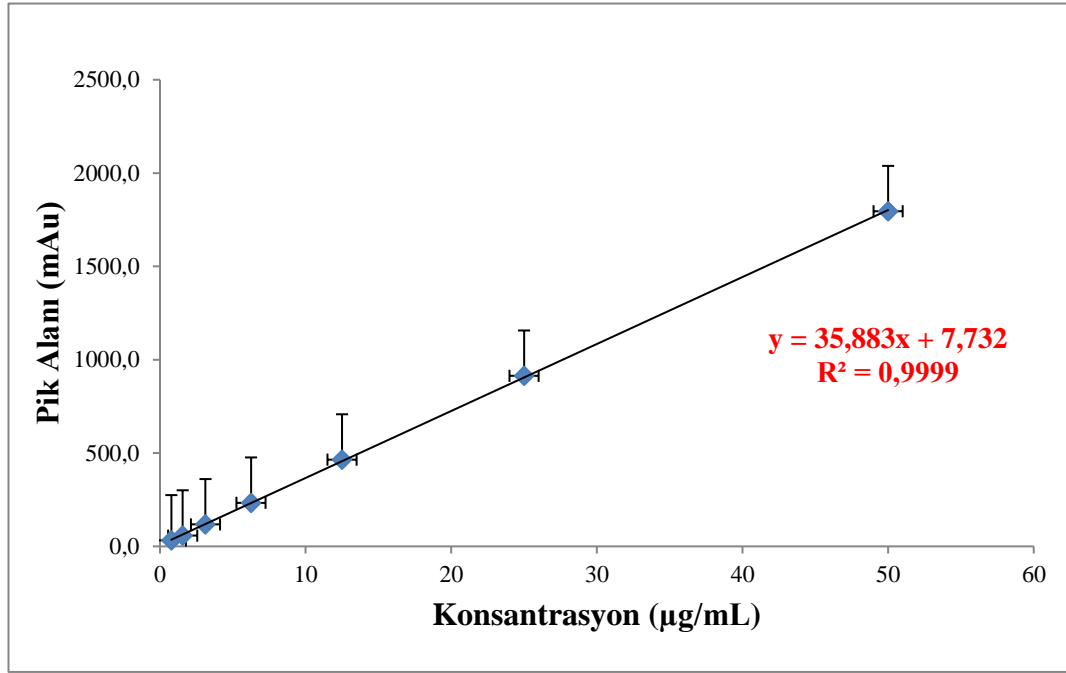
4.4. M3'ün İn Vitro Miktar Tayin Yöntemi'nin Geliştirilmesi ve Validasyon Çalışmaları

M3'ün metanol:asetonitril:su (35:40:25, h/h/h) çözücü ortamındaki UV spektrum çalışmaları sonucu maksimum absorbans verdiği dalga boyu 241 nm olarak saptanmış olup ön çalışmalardan elde edilen bilgiler ışığında miktar tayini ve validasyonu Bölüm 3.2.4.'de verilen kromatografik koşullar kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4.4.1. Doğrusallık

Ön çalışmalar sonucu belirlenen mobil faz ortamında (metanol:asetonitril:su (35:40:25, h/h/h)) hazırlanan standartlardan (0,78-50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) elde edilen pik alanları ve bunlara karşılık gelen konsantrasyonlardan hareketle doğru denklemi ve determinasyon katsayısı belirlenmiştir. Sonuçlar M3 standartları için elde edilen pik alanları ile konsantrasyonlar arasındaki ilişkinin doğrusal olduğunu göstermektedir. Doğrusallık bulguları Tablo 4.9.'da özetlenmiş ve kalibrasyon eğrisine ait grafik

Şekil 4.12.'de verilmiştir. Determinasyon katsayısının 1'e oldukça yakın saptanması, geliştirilen analitik yöntemin doğrusallık ölçütünü karşıladığını göstermektedir.



Şekil 4.12. M3'ün metanol:asetonitril:su (35:40:25, h/h/h) çözücü ortamındaki kalibrasyon doğrusu ve denklemi (Ortalama \pm SH; n=6).

Tablo 4.9. M3'e ait doğrusallık bulguları.

Doğru denklemi	$y = 35,883x + 7,732$
Eğimin standart hatası	0,569
Kesişimin standart hatası	1,421
Determinasyon katsayısı (R^2)	0,9999
Doğrusal aralık (µg/mL)	0,78-50
Nokta sayısı	7
LOD (µg/mL)	0,178
LOQ (µg/mL)	0,568

4.4.2. Duyarlılık

M3'ün in-vitro miktar tayininde kullanılmak üzere geliştirilen yöntemin LOD ve LOQ değerleri; 0,178 µg/mL ve 0,568 µg/mL olarak saptanmış olup Tablo 4.9.'da verilmiştir.

4.4.3. Doğruluk

M3'ün in vitro miktar tayininde kullanılmak üzere geliştirilen analitik yöntemin doğruluğunun gösterilmesi amacıyla yapılan çalışmalara ait bulgular Tablo 4.10.'da verilmiştir. Seçilen tüm konsantrasyon değerlerinde %VK, %2'nin altında saptanmıştır. Bu durum geliştirilen yöntemin belirlenen standartlara uygun olmakla birlikte analitik yöntemin doğruluğunu göstermektedir.

Tablo 4.10. M3'ün metanol:asetonitril:su (35:40:25, h/h/h) çözücü ortamındaki doğruluk bulguları.

Eklenen konsantrasyon (µg/mL)	Tayin edilen konsantrasyon (µg/mL)			%Geri Kazanım		
	0,78	6,25	50	0,78	6,25	50
1	0,685	6,289	50,084	87,778	100,624	100,168
2	0,662	6,127	49,003	84,920	98,038	98,006
3	0,657	6,286	48,872	84,205	100,579	97,744
4	0,660	6,283	49,705	84,563	100,535	99,410
5	0,676	6,403	49,772	86,706	102,452	99,544
6	0,687	6,320	49,917	88,135	101,114	99,834
Ortalama	0,671	6,285	49,559	86,051	100,557	99,118
SS	0,013	0,090	0,500	1,712	1,432	1,001
%VK	1,990	1,424	1,010	1,990	1,424	1,010

4.4.4. Kesinlik

M3'ün in vitro miktar tayininde kullanılmak üzere geliştirilen analitik yöntemin kesinlik parametresi üç düzeyde (tekrarlanabilirlik, ara kesinlik, tekrar elde

edilebilirlik) incelenmiş olup yöntemin kesinliğinin istatistiksel analizi için ortalama, SS ve %VK değerleri hesaplanmıştır. Seçilen tüm konsantrasyon değerlerinde %VK, %2'nin altında saptanması yöntemin belirlenen standartlara uygun olmakla birlikte analitik yöntemin kesinliğini kanıtlamaktadır.

- **Tekrarlanabilirlik**

M3'ün in vitro miktar tayininde kullanılan analitik yöntemin tekrarlanabilirliğinin gösterilmesi amacıyla yapılan çalışmalara ait bulgular Tablo 4.11.'de verilmiştir.

Tablo 4.11. M3'ün in vitro miktar tayin yöntemine ait tekrarlanabilirlik bulguları.

Eklenen konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Tayin edilen konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)		
	0,78	6,25	50
1	0,668	6,668	51,494
2	0,674	6,682	51,505
3	0,671	6,690	51,494
4	0,674	6,693	51,486
5	0,674	6,690	51,505
6	0,665	6,690	51,491
Ortalama	0,671	6,686	51,496
SS	0,004	0,009	0,008
%VK	0,004	0,009	0,008

- **Ara Kesinlik**

M3'ün in vitro miktar tayininde kullanılan analitik yöntemin ara kesinliğinin gösterilmesi amacıyla yapılan çalışmalara ait bulgular Tablo 4.12.'de verilmiştir.

Tablo 4.12. M3'ün in vitro miktar tayin yöntemine ait ara kesinlik bulguları (Ortalama \pm SS; n=3).

GÜN	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)		
	0,78	6,25	50
1	0,671	6,680	51,497
2	0,690	6,443	50,536
3	0,679	6,607	50,633
Ortalama	0,680	6,577	50,889
SS	0,010	0,121	0,529
%VK	1,439	1,844	1,040

- **Tekrar Elde Edilebilirlik**

M3'ün in vitro miktar tayininde kullanılan analitik yöntemin tekrar elde edilebilirliğinin gösterilmesi amacıyla yapılan çalışmalara ait bulgular Tablo 4.13.'de verilmiştir.

Tablo 4.13. M3'ün in vitro miktar tayin yöntemine ait tekrar elde edilebilirlik bulguları (Ortalama \pm SS; n=6).

Eklenen konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Tayin edilen konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)		
	0,78	6,25	50
1	0,668	6,557	51,413
2	0,660	6,504	51,369
3	0,648	6,473	51,452
4	0,665	6,584	51,124
5	0,676	6,518	51,330
6	0,682	6,590	50,876
Ortalama	0,667	6,537	51,261
SS	0,012	0,047	0,221
%VK	1,789	0,719	0,431

4.4.5. Dayanıklılık

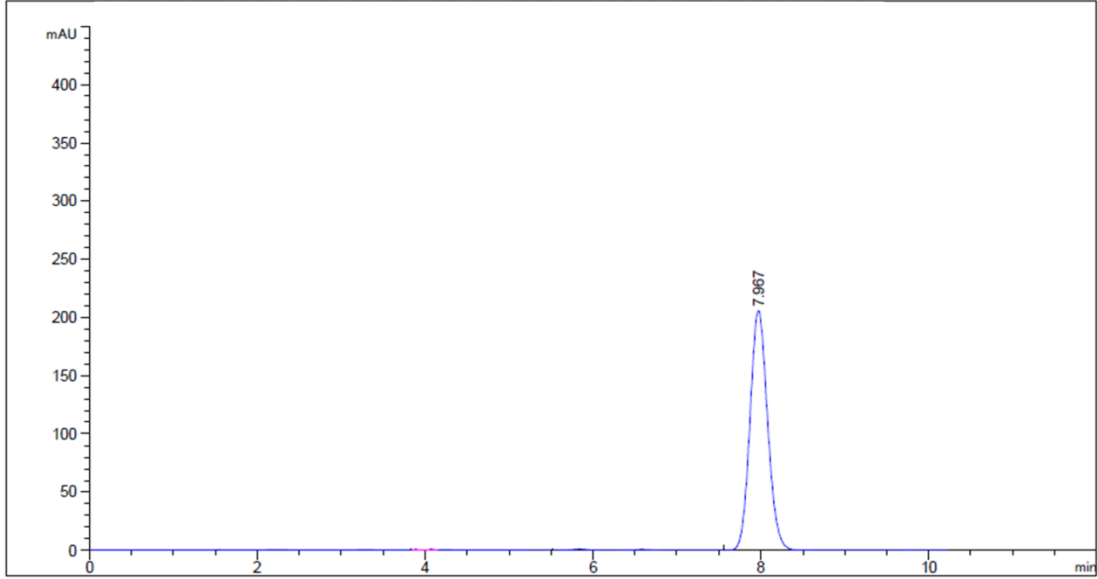
M3'ün in vitro miktar tayininde kullanılmak üzere geliştirilen analitik yöntemin dayanıklılığının gösterilmesi amacıyla yapılan çalışmalara ait bulgular Tablo 4.14.'de verilmiştir. Seçilen tüm koşul ve konsantrasyon değerlerinde %VK %2'nin altında saptanması yöntemin dayanıklılığını göstermiştir.

Tablo 4.14. M3'ün in vitro miktar tayin yöntemine ait dayanıklılık bulguları (Ortalama \pm SS; n=3).

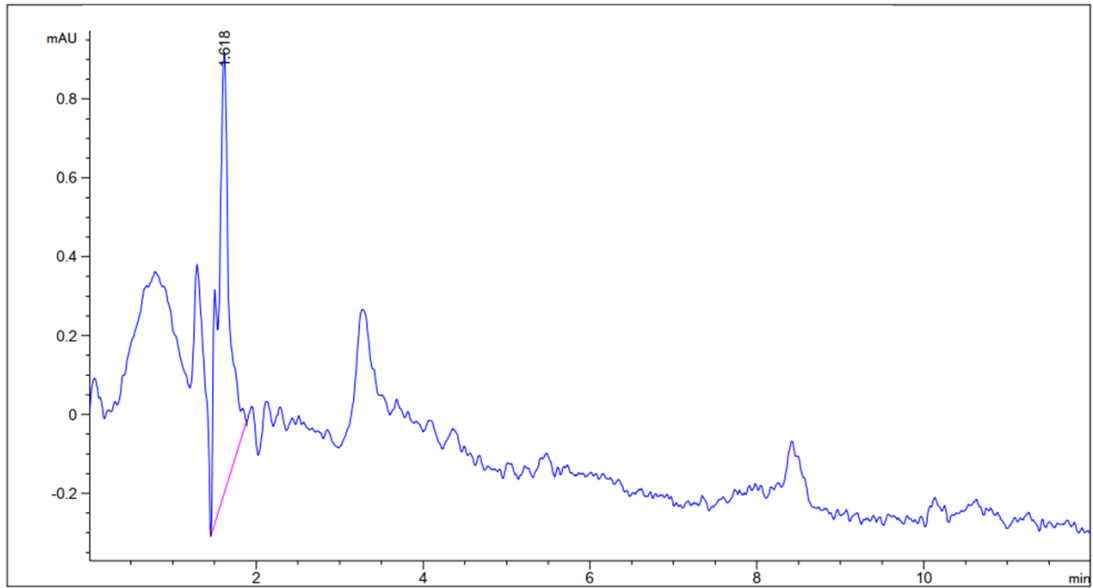
Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	0.saat	4.saat	12.saat	24.saat	24.saat (+4°C)	Ortalama	SS	%VK
0,78	0,681	0,679	0,669	0,691	0,677	0,679	0,008	1,178
6,25	6,443	6,316	6,454	6,570	6,503	6,457	0,093	1,445
50	50,533	51,232	51,775	51,691	51,466	51,339	0,498	0,970

4.4.6. Özgüllük

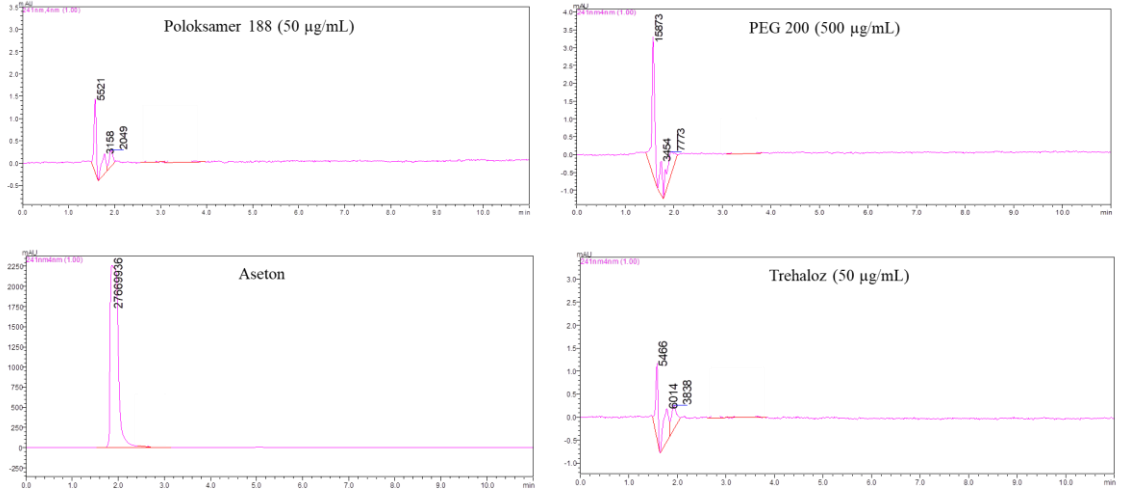
Geliştirilen analitik yöntemin M3'e özgüllüğünü göstermek amacı ile aynı dalga boyu aralığında etkin maddenin, çözünme ortamının ve formülasyonda kullanılan yardımcı maddelerin ayrı ayrı HPLC kromatogramları (Şekil 4.13. - Şekil 4.16.) karşılaştırıldığında çözünme ortamının ve yardımcı maddelerin M3'ün alıkonma zamanında (yaklaşık 7,9 dak.) pik vermediği gözlenmiştir. Etkin madde, çözücü ortamı ve yardımcı maddelerin kromatogramlarında herhangi bir girişimin saptanmaması geliştirilen analitik yöntemin belirlenen standartlara uygun olmakla birlikte özgül olduğunu göstermektedir.



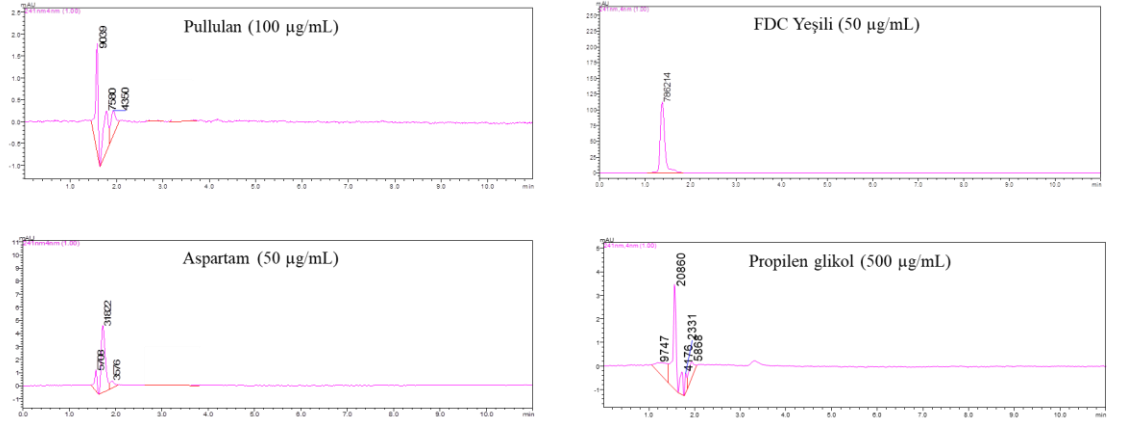
Şekil 4.13. M3'ün metanol:asetonitril:su (35:40:25, h/h/h) çözücü ortamında hazırlanan 50 µg/mL konsantrasyonundaki çözeltisine ait HPLC kromatogramı.



Şekil 4.14. M3'ün in vitro miktar tayini için geliştirilen yöntemdeki çözünme ortamına ait HPLC kromatogramı.



Şekil 4.15. Nanokristal formülasyon bileşimindeki yardımcı maddelerin metanol:asetonitril:su (35:40:25, h/h/h) çözücü ortamında hazırlanan çözeltilerine ait ayrı ayrı HPLC kromatogramları.



Şekil 4.16. ADF formülasyon bileşimindeki yardımcı maddelerin metanol:asetonitril:su (35:40:25, h/h/h) çözücü ortamında hazırlanan çözeltilerine ait ayrı ayrı HPLC kromatogramları.

4.5. Nanokristal Formülasyonu Hazırlanmasında Kullanılacak Yöntem ve Formülasyon Bileşenlerinin Belirlenmesi

4.5.1. M3 Nanokristallerinin Hazırlanmasında Kullanılacak Yöntem Parametrelerine İlişkin Önformülasyon Çalışma Sonuçları

Farklı yöntem koşulları (stabilizan yüzdesi (%0,1-0,5), karıştırma hızı (400-800 rpm) ve süresi (2,5-5 dak.), çöktürme sıcaklığı (10°C'nin altı ve 35°C), sonikasyon gücü (100-200 W) ve süresi (2,5-5 dak.) ve ilaç konsantrasyonu (0,5-1,25

$\mu\text{g/mL}$) ile stabilizan olarak PVA'nın kullanıldığı M3 nanokristallerinin hazırlanmasına ilişkin yapılan önformülasyon çalışma sonuçları Tablo 4.15.'de verilmiştir.

Tablo 4.15. Farklı yöntem koşulları ile PVA-M3 nanokristallerinin hazırlanmasına ilişkin yapılan önformülasyon çalışma sonuçları (Ortalama \pm SS; n=3).

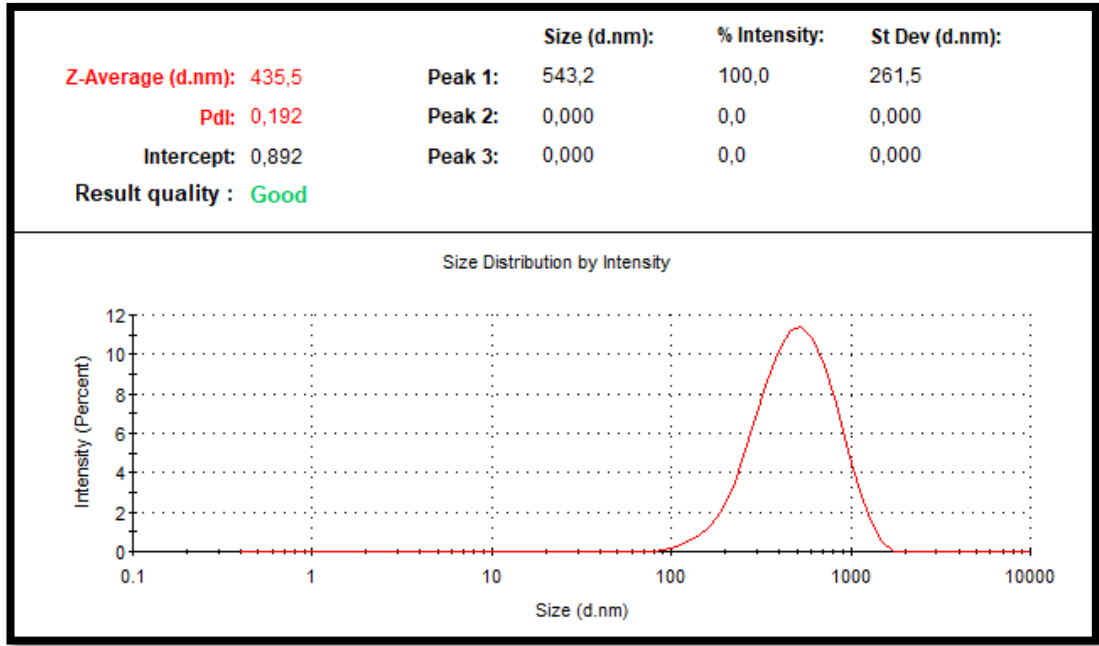
Formülasyon	Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
F1 (Ultrasantrifüj öncesi)	1238,3 \pm 2,4	0,221 \pm 0,093	-1,91 \pm 0,406
F1 (Ultrasantrifüj sonrası)	1102,3 \pm 3,6	0,174 \pm 0,197	-4,95 \pm 0,526
F2	1086,1 \pm 0,5	0,201 \pm 0,018	-4,16 \pm 0,478
F3	1685,5 \pm 0,1	0,563 \pm 0,256	-3,51 \pm 0,124
F4	1778,6 \pm 5,7	0,354 \pm 0,048	-5,03 \pm 0,045
F5	1904,9 \pm 2,3	0,157 \pm 0,166	-9,03 \pm 0,021
F6	811,2 \pm 4,4	0,375 \pm 0,213	-7,91 \pm 0,241
F7	894,8 \pm 4,3	0,244 \pm 0,113	-7,15 \pm 0,633
F8	1823,3 \pm 8,5	0,705 \pm 0,398	-4,1 \pm 0,528

4.5.2. Farklı Stabilizan Türü ve Oranları Kullanılarak Hazırlanan M3 Nanokristal Formülasyonlarına İlişkin Sonuçlar

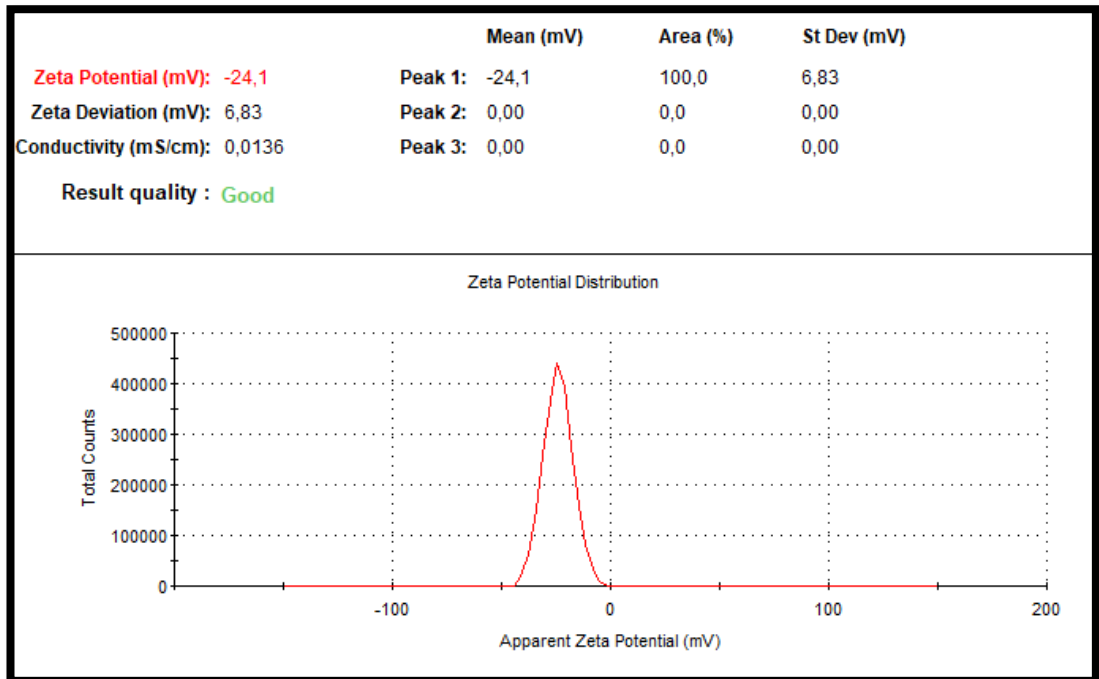
Farklı stabilizan türü ve oranları kullanılarak hazırlanan M3 nanokristallerinin formülasyon çıktıları Tablo 4.16.'da verilmiştir. Genel olarak polimerik stabilizanlar (PVA, PVP K30, SoluPlus[®]), SDC ve SLS ile hazırlanan nanosüspansiyonların partikül büyüklüğünün mikron boyutunda olduğu, poloksamer 188 ve poloksamer 407 ile hazırlanan nanosüspansiyonların partikül büyüklüğünün ise nano boyutta olduğu belirlenmiştir. PVP K30, poloksamer 188 ve poloksamer 407 ile hazırlanan tüm nanosüspansiyonlar için PDI değerlerinin, SoluPlus[®] (düşük stabilizan konsantrasyonları için; %0,05-0,1-0,5), poloksamer 188 ve poloksamer 407 ile hazırlanan nanosüspansiyonların ise, ZP değerlerinin istenilen değerlere yakın olduğu belirlenmiştir. Seçilen optimum nanosüspansiyon formülasyonu (%0,5 poloksamer 188'in kullanıldığı nanosüspansiyon; M3-NS) için partikül büyüklüğü dağılımı ve ZP ölçüm grafikleri Şekil 4.17. ve Şekil 4.18.'de verilmiştir.

Tablo 4.16. Farklı stabilizan türü ve oranları kullanılarak hazırlanan M3 nanokristallerinin formülasyon çıktıları (Ortalama \pm SS; n=3).

Stabilizan	Parametre	Stabilizan Yüzdesi (%)				
		0,05	0,1	0,5	1,0	2,0
PVP K30	PB (nm)	2533,3 \pm 7,8	2724,7 \pm 7,5	1282,0 \pm 6,7	2036,3 \pm 7,2	2088,0 \pm 8,2
	PDI	0,275 \pm 0,049	0,269 \pm 0,284	0,310 \pm 0,163	0,363 \pm 0,219	0,362 \pm 0,186
	ZP (mV)	-16,9 \pm 0,4	-13,8 \pm 0,5	-12,7 \pm 0,4	-11,5 \pm 0,4	-9,1 \pm 0,6
PVA	PB (nm)	969,6 \pm 2,2	883,4 \pm 0,4	1823,3 \pm 8,5	993,6 \pm 5,3	1124,3 \pm 4,0
	PDI	0,304 \pm 0,188	0,609 \pm 0,221	0,705 \pm 0,398	0,585 \pm 0,196	0,230 \pm 0,138
	ZP (mV)	-5,9 \pm 0,521	-6,3 \pm 0,708	-4,7 \pm 0,528	-3,0 \pm 0,586	-3,5 \pm 0,692
SoluPlus®	PB (nm)	1049,3 \pm 3,9	728,6 \pm 7,0	976,0 \pm 6,0	77,0 \pm 0,592	64,3 \pm 0,762
	PDI	0,563 \pm 0,278	0,824 \pm 0,369	0,620 \pm 0,207	0,127 \pm 0,095	0,055 \pm 0,105
	ZP (mV)	-22,7 \pm 0,3	-21,5 \pm 0,8	-22,4 \pm 0,2	-9,4 \pm 1,0	-12,4 \pm 1,3
Poloksamer 188	PS (nm)	532,6 \pm 0,7	487,8 \pm 2,8	431,4 \pm 1,2	472,5 \pm 3,0	569,4 \pm 2,4
	PDI	0,223 \pm 0,127	0,416 \pm 0,125	0,362 \pm 0,087	0,404 \pm 0,131	0,229 \pm 0,076
	ZP (mV)	-24,7 \pm 0,6	-28,1 \pm 0,8	-23,7 \pm 0,7	-25,2 \pm 1,0	-10,9 \pm 0,5
Poloksamer 407	PS (nm)	615,7 \pm 2,4	534,6 \pm 1,78	480,5 \pm 1,3	504,5 \pm 2,7	673,9 \pm 2,7
	PDI	0,393 \pm 0,67	0,291 \pm 0,169	0,381 \pm 0,1	0,200 \pm 0,123	0,226 \pm 0,152
	ZP (mV)	-20,1 \pm 0,4	-24,4 \pm 0,4	-19,3 \pm 0,5	-17,6 \pm 0,5	-19,4 \pm 0,4
SDC	PS (nm)	1950,7 \pm 11,7	1633,7 \pm 0,9	799,7 \pm 5,2	916,7 \pm 9,4	315,6 \pm 2,4
	PDI	0,386 \pm 0,129	0,509 \pm 0,178	0,991 \pm 0,091	0,859 \pm 0,246	0,434 \pm 0,171
	ZP (mV)	-51,2 \pm 0,8	-48,7 \pm 0,9	-49,6 \pm 0,9	-50,3 \pm 1,2	-55,3 \pm 1,0
SLS	PS (nm)	1289,7 \pm 3,5	1325,3 \pm 4,8	591,5 \pm 4,0	866,1 \pm 4,2	6018,0 \pm 36,6
	PDI	0,386 \pm 0,113	0,395 \pm 0,121	0,593 \pm 0,323	0,449 \pm 0,218	0,954 \pm 0,254
	ZP (mV)	-57,7 \pm 0,9	-57,0 \pm 0,7	-54,0 \pm 1,2	-72,1 \pm 1,1	-70,8 \pm 1,5



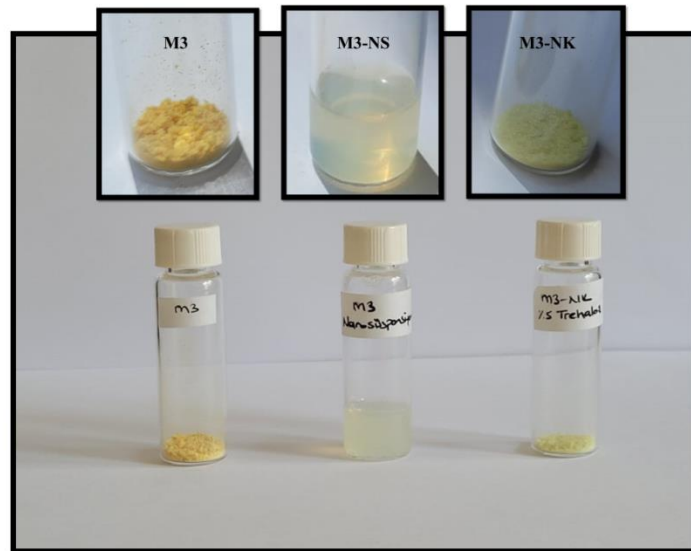
Şekil 4.17. M3-NS'nin partikül büyüklüğü dağılım grafiği.



Şekil 4.18. M3-NS'nin zeta potansiyel ölçüm grafiği.

4.5.3. Farklı Kriyoprotektan Türü ve Oranları Kullanılarak M3 Nanokristal Formülasyonlarının Kurutulmasına İlişkin Sonuçlar

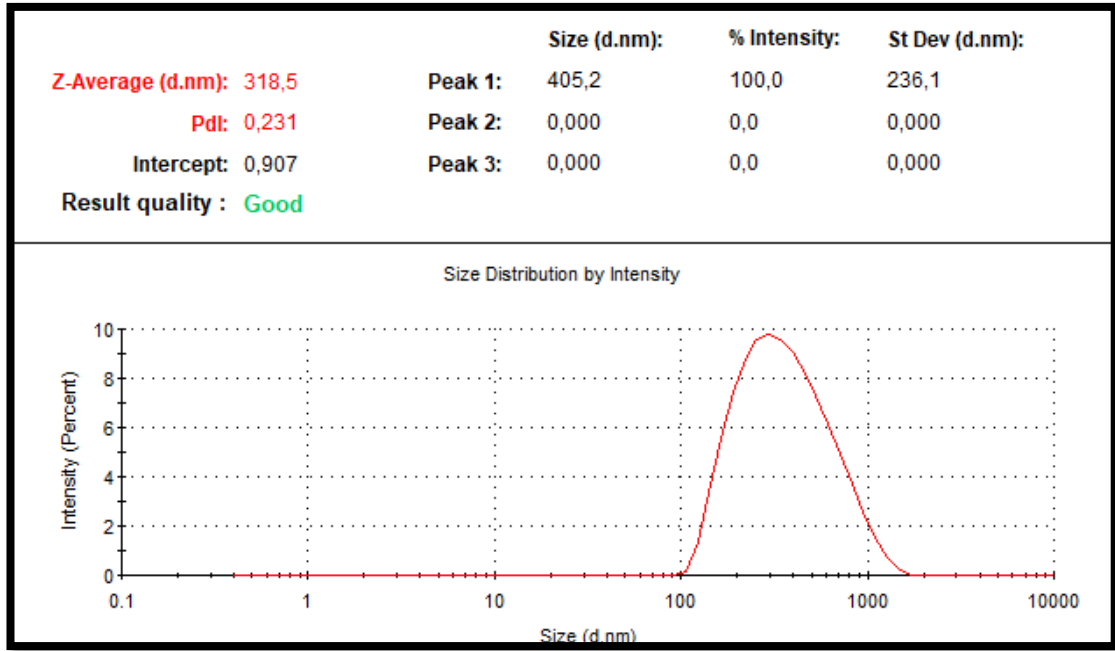
Kriyoprotektan kullanılmadan dondurularak kurutulmuş M3 nanokristal formülasyonu için partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerleri sırasıyla $547,8 \pm 10,3$ nm, $0,545 \pm 0,075$, $-20,1 \pm 0,5$ mV olarak saptanmıştır. Seçilen optimum nanosüspansiyon formülasyonunun (%0,5 poloksamer 188 ile hazırlanan nanosüspansiyon (M3-NS); $431,4 \pm 1,2$ nm, $0,362 \pm 0,087$, $-23,7 \pm 0,7$ mV) kriyoprotektan kullanılmadan dondurularak kurutulmasından sonra genel olarak partikül büyüklüğü ve PDI değerlerinde bir artış ve ZP değerlerinde küçük bir düşüş olduğu görülmektedir. Farklı kriyoprotektan türü ve oranları kullanılarak hazırlanan M3 nanokristallerinin formülasyon çıktıları Tablo 4.17.'de verilmiştir. Deneysel olarak en düşük partikül büyüklüğü ($320,2 \pm 15,3$ nm) ve en iyi ZP değeri ($-27,4 \pm 0,1$ mV) %5 trehaloz ile dondurularak kurutulmuş M3 nanokristal formülasyonunda elde edilmiştir. Elde edilen optimum M3 nanosüspansiyon formülasyonu (M3-NS) ve optimum dondurularak kurutulmuş M3 nanokristal formülasyonu (M3-NK) resimleri Şekil 4.19.'da verilmiştir. Seçilen optimum nanokristal formülasyonu (%0,5 poloksamer 188'in kullanıldığı nanosüspansiyon; M3-NS) için partikül büyüklüğü dağılımı ve ZP ölçüm grafikleri Şekil 4.20. ve Şekil 4.21.'de gösterilmiştir.



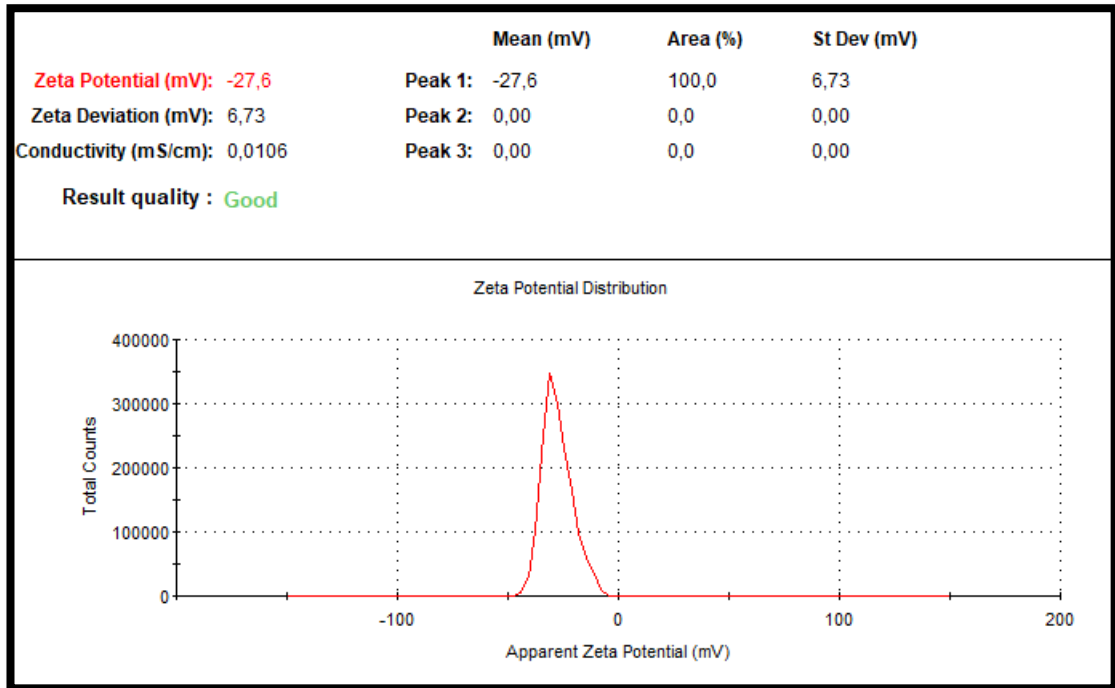
Şekil 4.19. Optimum M3 nanosüspansiyon formülasyonu (M3-NS) ve dondurularak kurutulmuş M3 nanokristal formülasyonu (M3-NK).

Tablo 4.17. Farklı kriyoprotektan türü ve oranları kullanılarak hazırlanan M3 nanokristallerinin formülasyon çıktıları (Ortalama \pm SS; n=3).

Kriyoprotektan	Parametre	Kriyoprotektan Yüzdesi (%)		
		1,25	2,5	5,0
Mannitol	PB (nm)	731,2 \pm 50,0	492,4 \pm 20,8	390,0 \pm 24,0
	PDI	0,576 \pm 0,020	0,469 \pm 0,111	0,347 \pm 0,028
	ZP (mV)	-19,3 \pm 0,6	-23,1 \pm 0,6	-25,9 \pm 0,2
Trehaloz	PB (nm)	649,8 \pm 53,6	476,3 \pm 30,6	320,2 \pm 15,3
	PDI	0,543 \pm 0,004	0,446 \pm 0,009	0,311 \pm 0,042
	ZP (mV)	-23,0 \pm 1,4	-25,5 \pm 1,3	-27,4 \pm 0,2
Dekstroz	PB (nm)	449,1 \pm 24,7	425,2 \pm 4,6	451,8 \pm 28,0
	PDI	0,518 \pm 0,030	0,413 \pm 0,031	0,417 \pm 0,013
	ZP (mV)	-25,4 \pm 0,2	-26,8 \pm 0,6	-25 \pm 0,7
Sükroz	PB (nm)	477,2 \pm 29,2	507,7 \pm 47,3	42,7 \pm 4,7
	PDI	0,479 \pm 0,017	0,437 \pm 0,007	0,423 \pm 0,029
	ZP (mV)	-25,4 \pm 0,6	-23,5 \pm 0,4	-27,1 \pm 0,9
Dekstran	PB (nm)	733,6 \pm 94,5	705,3 \pm 48,3	376,5 \pm 42,7
	PDI	0,667 \pm 0,025	0,649 \pm 0,074	0,482 \pm 0,064
	ZP (mV)	-23,9 \pm 0,3	-20,4 \pm 1,2	-22,1 \pm 2,2



Şekil 4.20. M3-NK'nın partikül büyüklüğü dağılım grafiği.



Şekil 4.21. M3-NK'nın zeta potansiyel ölçüm grafiği.

4.6. Ağızda Dağılan Film Formülasyonlarının Hazırlanmasında Kullanılacak Yöntem ve Formülasyon Bileşenlerinin Belirlenmesi

Önformülasyon Çalışmaları ile En Uygun Plastikleştiricinin Belirlenmesi

Pullulan bazlı ADF formülasyonlarının hazırlanmasında en uygun plastikleştiricinin belirlenmesi amacıyla yapılan önformülasyon çalışma sonuçları Tablo 4.18.'de verilmiştir. Genel olarak gliserol ile hazırlanan ADF'ler (ADF-1) daha uzun sürede (20 saat) kurumuştur. Gliserol bazlı ADF'ler (ADF-1) her ne kadar homojen ve iyi yayılabilir özellikte olsa da çok fazla yapışkan olmaları ve kalıptan çıkarken şekil deformasyonuna uğramaları nedeni ile beklenen ve istenilen film özelliklerini tam olarak taşımamaktadır. Sorbitol ile hazırlanan ADF'ler (ADF-2) homojen ve iyi yayılabilir özellikte olmalarına rağmen oldukça sert ve kırılğan yapıya sahiptirler. Kalıptan çıkarken kırılarak parçalanma sorunu yaşayan sorbitol bazlı ADF'ler (ADF-2) istenilen film esnekliğine sahip olmamaları nedeni ile daha ileri ADF formülasyon çalışmalarında tercih edilmemiştir. Propilen glikol ile hazırlanan ADF'ler (ADF-3) homojen, iyi yayılabilir, esnek ve uygun sertlikte üretilmişlerdir. Kalıptan çok rahat çıkmalarının yanı sıra herhangi bir şekil deformasyonuna uğramamaları nedeni ile etkin maddeli ADF'lerin hazırlanması için plastikleştirici madde olarak propilen glikol seçilmiştir.

Tablo 4.18. Önformülasyon çalışmalarından elde edilen formülasyon parametreleri.

Formülasyon	Homojenlik	Yayılabilirlik	Yapışkanlık ve Kalıptan Çıkma	Sertlik	Kırılğanlık
ADF-1	+++	++	+	++	++
ADF-2	+++	++	++	+	+
ADF-3	+++	+++	+++	+++	+++

Morfolojik incelemelere dayalı ADF özelliklerinin sonucu: +++ = çok iyi; ++ = iyi; + = kötü

4.7. M3-NK İçeren Propilen Glikol Bazlı Ağızda Dağılan Filmlerin Karakterizasyonu

4.7.1. Kütle Tekdüzeliği (Ağırlık Değişkenliği) Testi

Tez kapsamında hazırlanan optimum ADF formülasyonlarına (M3-ADF) ait kütle tekdüzeliği bulguları Tablo 4.19.'da verilmiştir. Avrupa Farmakopesi'ne göre ortalama film ağırlığı 80 mg'dan az olan formülasyonlar için, ikiden fazla ADF, ortalama ağırlığın \pm %10'luk sapma değerini geçmemeli ve hiçbiri bu yüzdenin iki katından fazla sapma göstermemelidir (201). Sonuçlara göre ortalama kuru film ağırlığı $79,05 \pm 1,3$ mg olarak belirlenmiştir ve genel olarak film ağırlıklarının 76,7 - 81,1 mg arasında değiştiği grlmştir. Sonuç olarak hazırlanan ADF'lerin bireysel ağırlıklarındaki sapmaların, Avrupa Farmakopesi'nde belirtilen sınırlar içinde olduğu, hiçbir filmin ağırlığının sınır dışına çıkmadığı ve kütle tekdüzeliği için belirtilen koşulları sağladığı görülmektedir.

Tablo 4.19. M3-ADF formülasyonlarının kütle tekdüzeliği bulguları.

ADF No	Yaş Kütle (mg)	Kuru Film Ağırlığı (mg)
1	809,5	78,7
2	814,4	79,4
3	805,3	76,8
4	806,5	79,3
5	800,3	76,7
6	812,3	78,5
7	813,5	78,0
8	813,8	79,7
9	801,5	77,2
10	807	78,9
11	804,1	77,4
12	809,8	78,7
13	805,8	79,1
14	814,7	79,7
15	814,5	79,7
16	813,1	81,0
17	811,9	79,6
18	811,5	80,5
19	816,2	80,9
20	811,6	81,1
Ortalama	809,86	79,05
SS	4,54	1,30
% BSS	0,56	1,64
En düşük	800,3	76,7
En yüksek	716,2	81,1
Alt sınır (Ortalama - %10 SS)	-	71,2
Üst sınır (Ortalama + %10 SS)	-	87,0

4.7.2. Kalınlık Testi

M3-ADF formülasyonlarının kalınlık kontrolü Bölüm 3.2.7.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiş olup elde edilen bulgular Tablo 4.20.'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hazırlanan M3-ADF formülasyonlarının kalınlığı $0,129 \pm 0,003$ mm olarak saptanmıştır.

Tablo 4.20. M3-ADF formülasyonlarının kalınlık kontrol tayinine ait bulgular.

ADF No	Merkez (mm)	1.Köşe (mm)	2.Köşe (mm)	3.Köşe (mm)	4.Köşe (mm)	Ortalama Film Kalınlığı (mm)
1	0,071	0,147	0,127	0,159	0,163	0,133
2	0,044	0,132	0,148	0,155	0,164	0,129
3	0,067	0,168	0,154	0,136	0,134	0,132
4	0,079	0,160	0,158	0,108	0,139	0,129
5	0,064	0,149	0,157	0,130	0,128	0,126
6	0,088	0,134	0,115	0,132	0,167	0,127
7	0,061	0,149	0,128	0,136	0,170	0,129
8	0,067	0,126	0,145	0,168	0,122	0,128
9	0,067	0,141	0,149	0,124	0,179	0,132
10	0,052	0,120	0,152	0,143	0,156	0,125
Ortalama						0,129
SS						0,003
% BSS						1,989
En düşük						0,126
En yüksek						0,133

4.7.3. Yüzey pH Testi

Bölüm 3.2.7.'de belirtilen şekilde gerçekleştirilen yüzey pH çalışmalarından elde edilen bulgular Tablo 4.21.'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hazırlanan M3-ADF formülasyonlarının yüzey pH'sı $6,29 \pm 0,10$ olarak saptanmıştır.

Tablo 4.21. M3-ADF formülasyonlarının yüzey pH ölçümüne ait bulgular.

ADF No	pH Değeri
1	6,31
2	6,14
3	6,20
4	6,45
5	6,29
6	6,33
Ortalama	6,29
SS	0,10
% BSS	1,57

4.7.4. Nem Tayini

M3-ADF formülasyonlarının nem tayini Bölüm 3.2.7.'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiş olup elde edilen bulgulara göre filmlerin nem içerikleri %6,58 olarak tespit edilmiştir.

4.7.5. İçerik Tekdüzeligi Testi

M3-ADF formülasyonlarının içerik tekdüzeligi çalışmaları Bölüm 3.2.7.'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiş olup elde edilen bulgular Tablo 4.22.'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hazırlanan ADF formülasyonlarının içerik tekdüzelikleri %91,96-%102,84 arasında tespit edilmiş olup, ortalama içerik tekdüzeligi $95,36 \pm 3,15$ olarak saptanmıştır. Ayrıca Eşitlik 3.2. kullanılarak yapılan

hesaplamalar sonucunda hazırlanan ADF'ler için kabul değeri 10,7 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.22. M3-ADF formülasyonlarının içerik tekdüzeliği bulguları.

ADF No	İçerik Tekdüzeliliği (%)
1	92,39
2	97,48
3	92,06
4	95,93
5	94,88
6	95,22
7	102,84
8	93,56
9	91,96
10	97,28
Ortalama	95,36
SS	3,15
% BSS	3,3

4.7.6. Mekanik Kontroller

M3-ADF formülasyonlarının mekanik kontrolleri Bölüm 3.2.7.'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiş olup, elde edilen bulgular Tablo 4.23.'de verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hazırlanan ADF formülasyonlarının % uzama, elastik modülüs ve gerilme direnci değerleri sırasıyla $420,38 \pm 9,44$; $0,216 \pm 0,02$ MPa; $6,29 \pm 0,25$ MPa olarak saptanmıştır. Ayrıca tüm ADF formülasyonlarında katlanma direncinin 200'den büyük olduğu belirlenmiştir.

Tablo 4.23. M3-ADF formülasyonlarının mekanik kontrollerine ait bulgular.

ADF No	% Uzama	Elastik Modülüs (MPa)	Gerilme Direnci (MPa)
1	424,9	0,200	6,2
2	429,0	0,199	6,6
3	407,2	0,250	6,3
Ortalama	420,4	0,216	6,3
SS	9,44	0,02	0,25
% BSS	2,3	11,0	4,0

4.7.7. Dağılma Testleri

M3-ADF formülasyonlarının dağılma testleri Bölüm 3.2.7.'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiş olup distile su ortamında yapılan dağılma testine ait elde edilen bulgular Tablo 4.24.'de ve pH 5,7 yapay tükürük sıvısı ortamında yapılan dağılma testine ait elde edilen bulgular Tablo 4.25.'de verilmiştir. Genel olarak yapay tükürük ortamında yapılan çalışma verilerin distile su ortamında yapılan çalışma verilerinden daha yüksek olduğu tespit edilmekle birlikte veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p>0,05$). Distile su ortamında ADF'lerin dağılma süresi petri kabı yöntemine göre $21,3 \pm 2,3$ sn ve damla yöntemine göre $12,7 \pm 0,9$ sn olarak belirlenmiştir. pH 5,7 yapay tükürük ortamında ise, ADF'lerin dağılma süresi petri kabı yöntemine göre $23,0 \pm 1,2$ sn ve damla yöntemine göre $14,5 \pm 0,5$ sn olarak hesaplanmıştır.

Tablo 4.24. M3-ADF formülasyonlarının distile su ortamında yapılan dağılma testine ait bulgular.

ADF No	Dağılma Süresi (sn)		
	Petri Kabı Yöntemi		Damla Yöntemi
	ADF'in Dağılmaya Başladığı Süre	ADF'in Tamamen Kaybolduğu Süre	
1	5	20	12
2	3	17	14
3	6	23	14
4	4	22	11
5	5	19	12
6	3	27	13
Ortalama	4,3	21,3	12,7
SS	1,1	3,2	1,1

Tablo 4.25. M3-ADF formülasyonlarının pH 5,7 yapay tükürük sıvısı ortamında yapılan dağılma testine ait bulgular.

ADF No	Dağılma Süresi (sn)		
	Petri Kabı Yöntemi		Damla Yöntemi
	ADF'in Dağılmaya Başladığı Süre	ADF'in Tamamen Kaybolduğu Süre	
1	6	23	12
2	5	21	14
3	8	24	14
4	8	26	13
5	7	19	12
6	5	25	15
Ortalama	6,5	23,0	13,3
SS	1,2	1,2	0,5

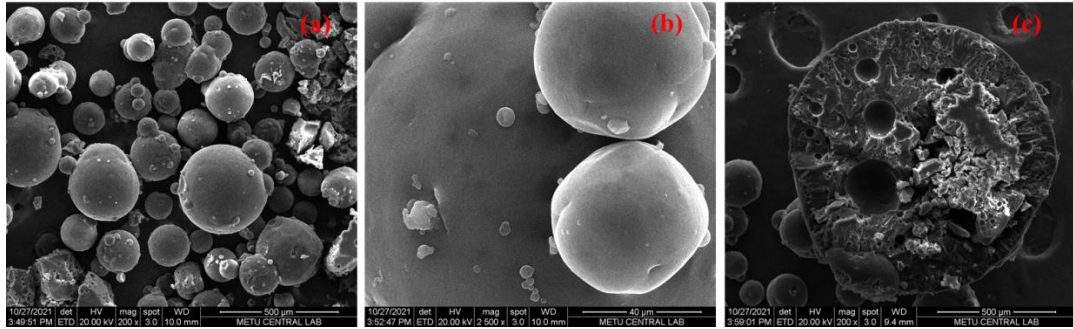
4.8. Caco-2 Permeabilite Çalışmalarında Kullanılacak Nanokristal ve Ağızda Dağılan Film Formülasyonlarının Fizikokimyasal Analiz Sonuçları

M3, M3-NK ve M3-ADF formülasyonlarının fizikokimyasal özelliklerini tayin etmek amacıyla; taramalı elektron mikroskop (SEM) ile morfolojik özelliklerin analizi, X-ışını kırınımı analizi (XRD), fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopi analizi (FT-IR) ve diferansiyel taramalı kalorimetri analizi (DSC), Bölüm 3.2.1.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

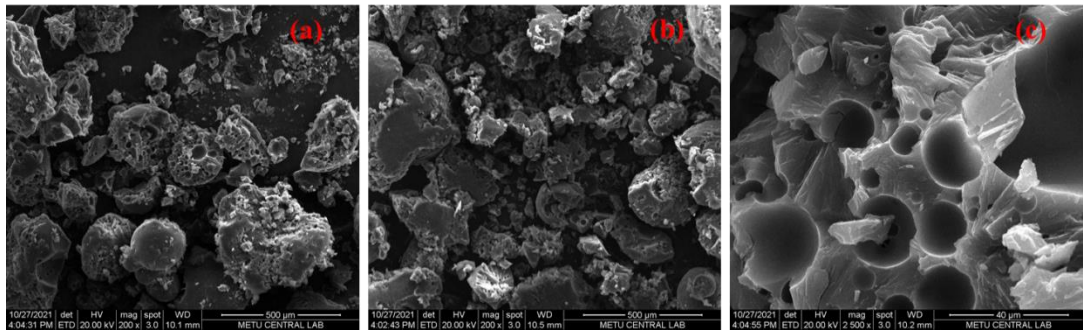
4.8.1. Taramalı Elektron Mikroskop Analizi

M3-NK ve M3-ADF formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan yardımcı maddelerden poloksamer 188'in, fiziksel karışımların (FK-1 ve FK-2), M3-NK, M3-ADF'nin yüzey morfolojisi, partikül büyüklüğü ve şeklini incelemek amacıyla yapılan SEM analizi sonuçları Şekil 4.22.-Şekil 4.26.'de gösterilmiştir. M3-ADF

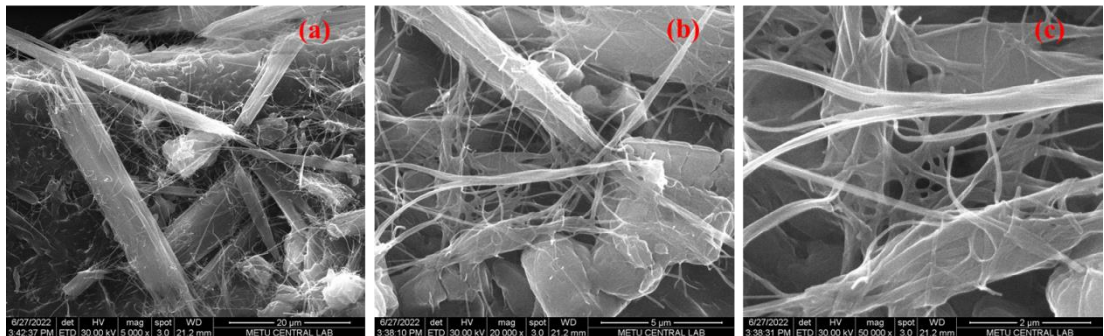
formülasyonlarının yüzey görüntüleri haricinde enine kesit görüntüleri de incelenmiş olup Şekil 4.27.'de verilmiştir.



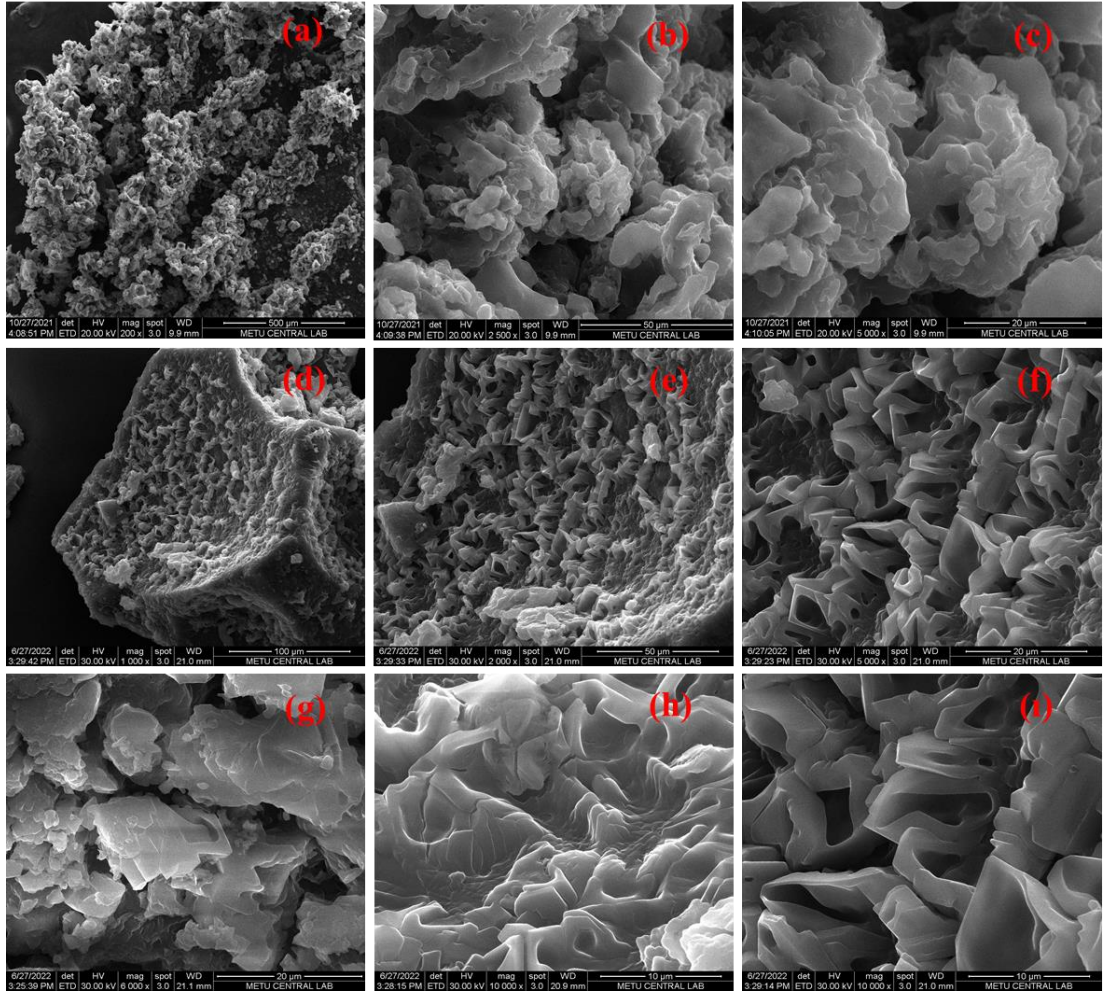
Şekil 4.22. Poloksamer 188'in farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri (200x (a, c) ve 2500x (b)).



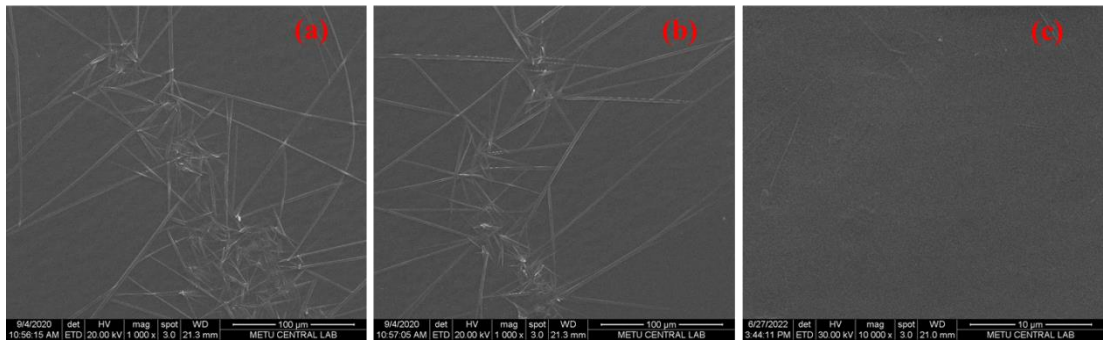
Şekil 4.23. FK-1'in farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri (200x (a, b) ve 2500x (c)).



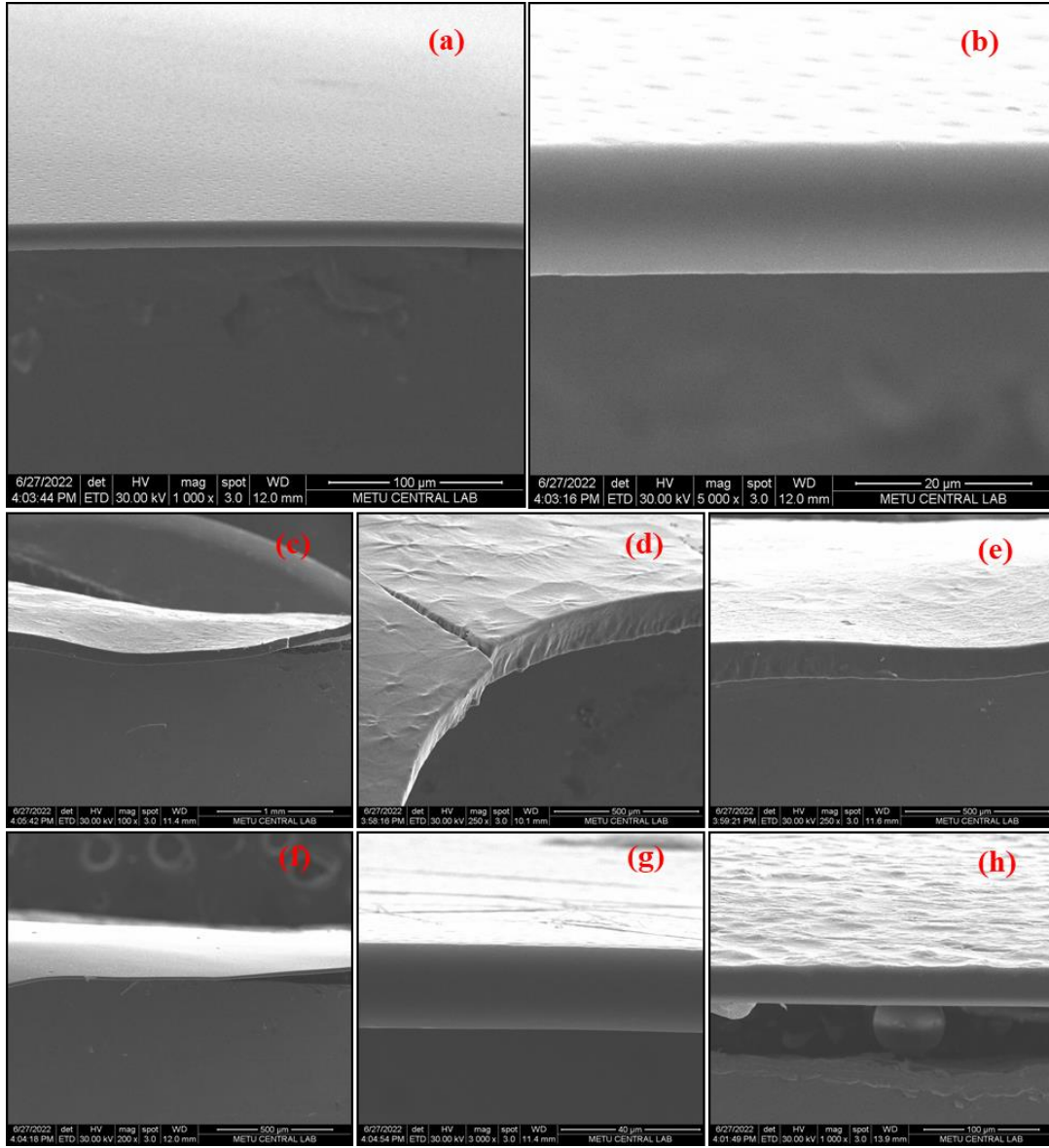
Şekil 4.24. FK-2'nin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri (5000x (a), 20.000x (b) ve 50.000x (c)).



Şekil 4.25. M3-NK'nın farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri (200x (a), 1000x (d), 2000x (e), 2500x (b), 5000x (c, f), 6000x (g) ve 10.000x (h, i)).



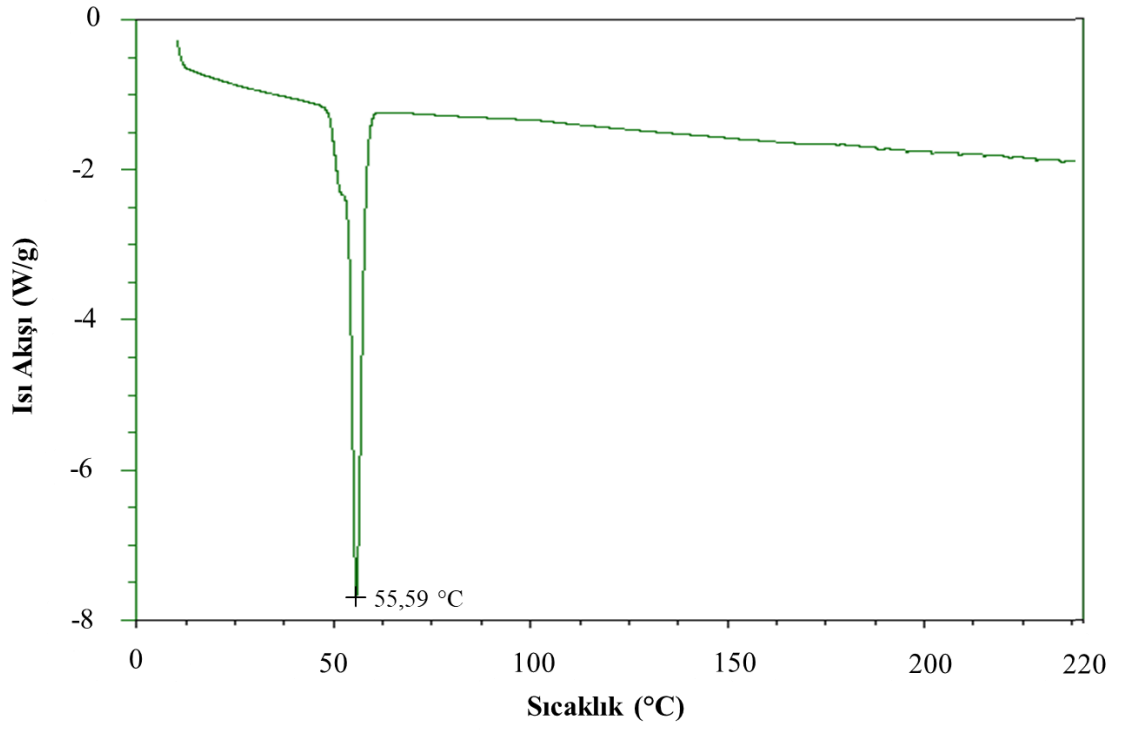
Şekil 4.26. M3-ADF'in farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri (yüzey) (1000x (a, b) ve 10.000x (c)).



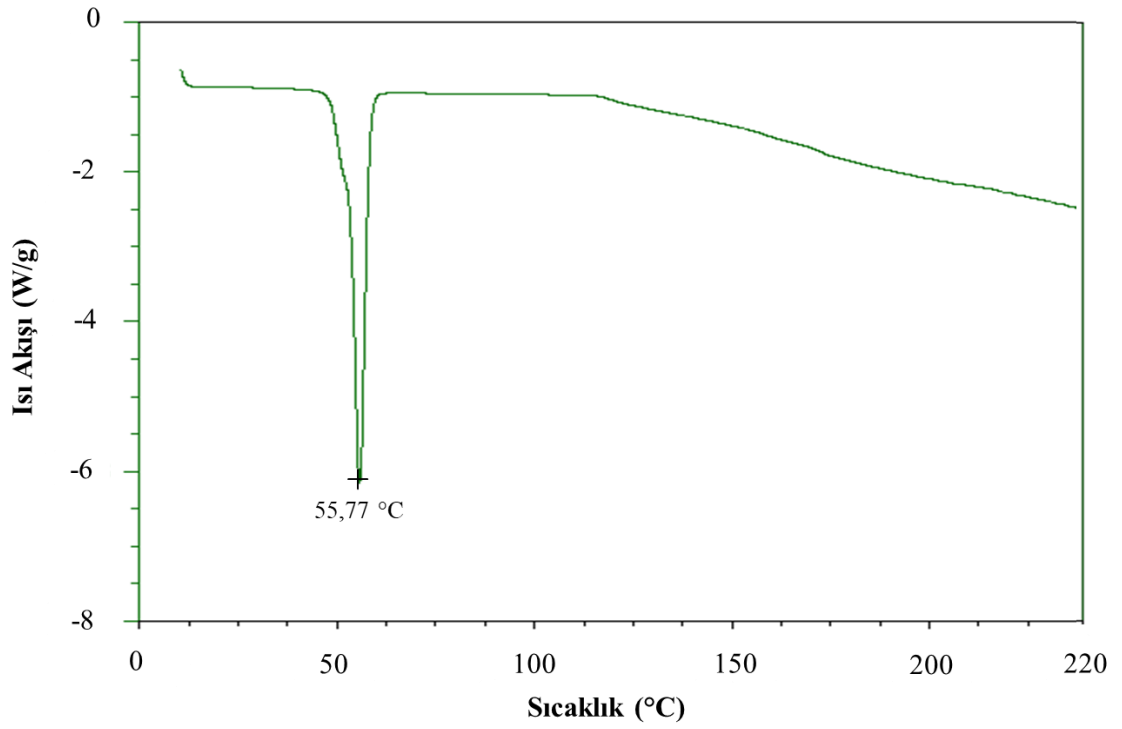
Şekil 4.27. M3-ADF'nin farklı büyütme oranlarındaki SEM görüntüleri (enine kesit) (100x (c), 200x (f), 250x (d, e), 1000x (a, h), 3000x (g) ve 5000x (b)).

4.8.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Analizi

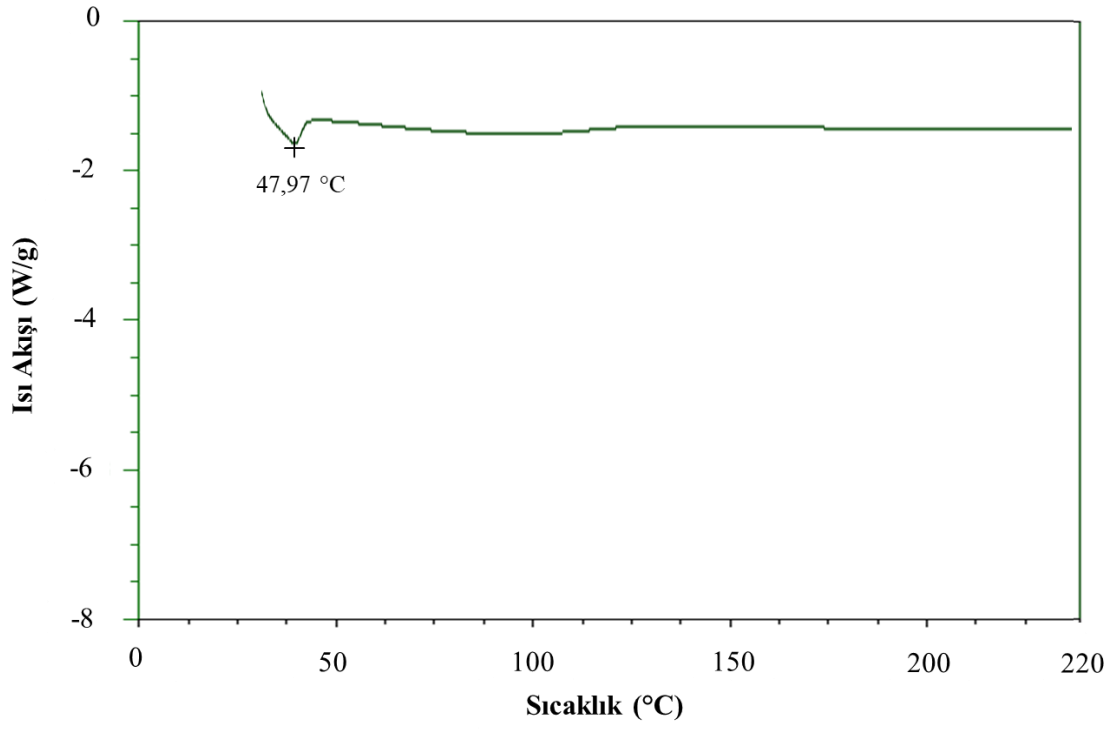
M3-NK ve M3-ADF formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan yardımcı maddelerden poloksamer 188, pullulan, fiziksel karışımlar (FK-1 ve FK-2), M3-NK, M3-ADF'nin DSC analizleri sonucu elde edilen termogramlar Şekil 4.28.–Şekil 4.33.'de gösterilmiştir. M3-NK ve M3-ADF formülasyon bileşiminde bulunan ve DSC termogramları ayrı ayrı verilmiş olan analizlerin üst üste çakıştırılmış görüntüleri de Şekil 4.34. ve Şekil 4.35.'de verilmiştir.



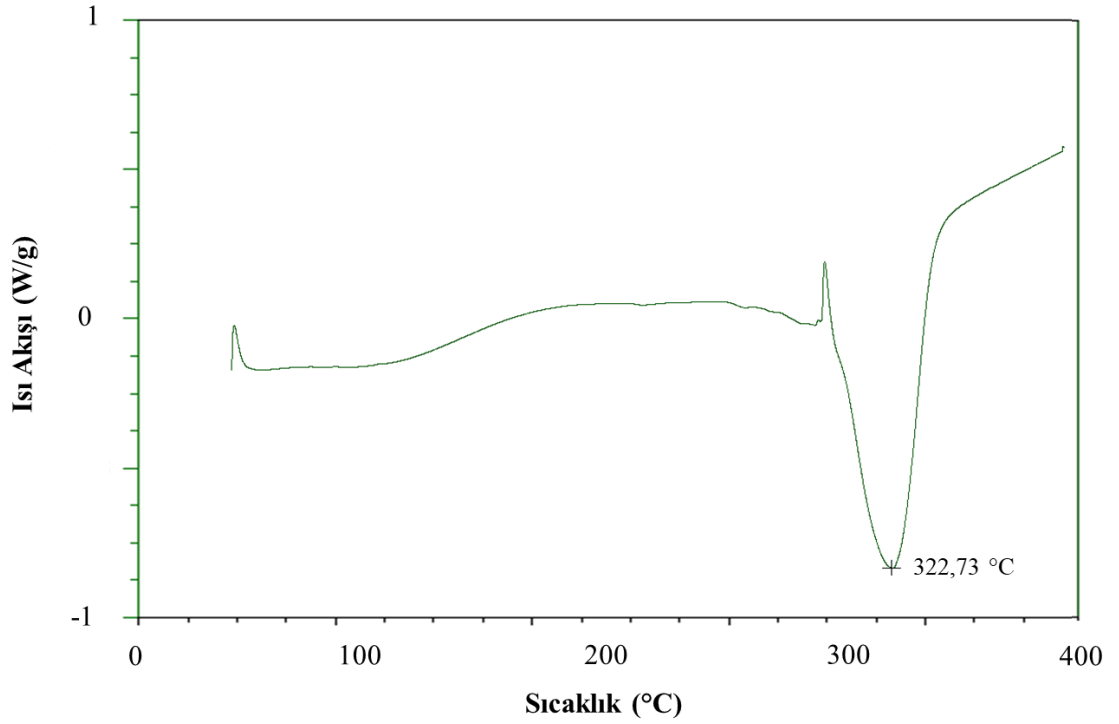
Şekil 4.28. Poloksamer 188'e ait DSC termogramı.



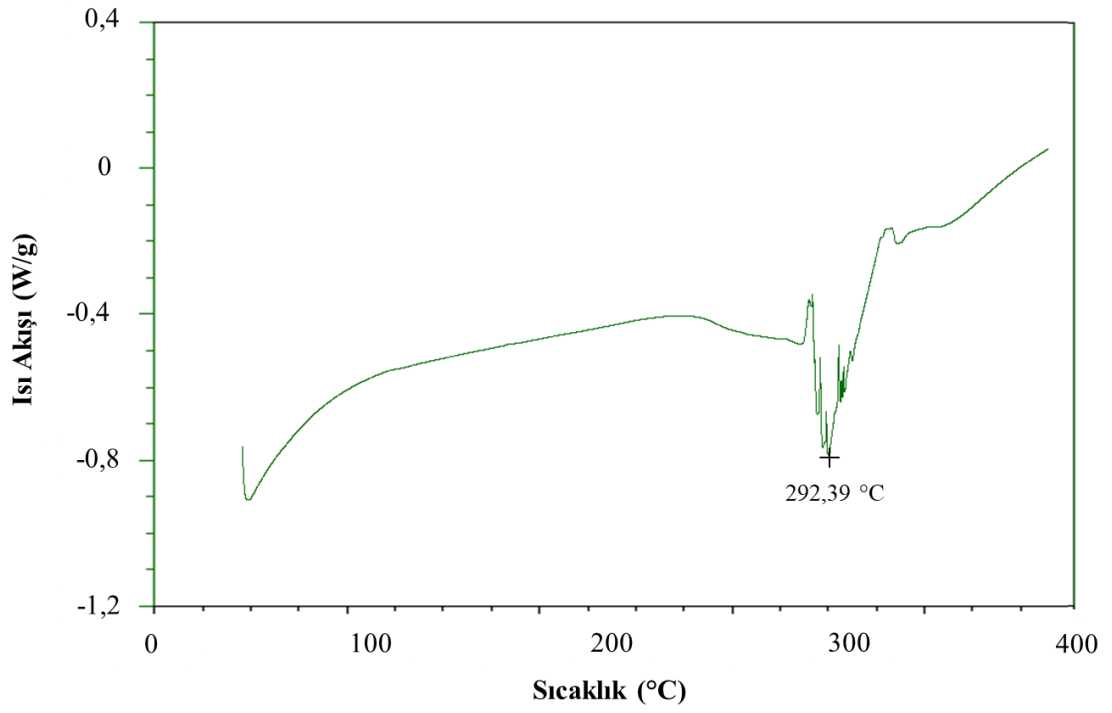
Şekil 4.29. FK-1'e ait DSC termogramı.



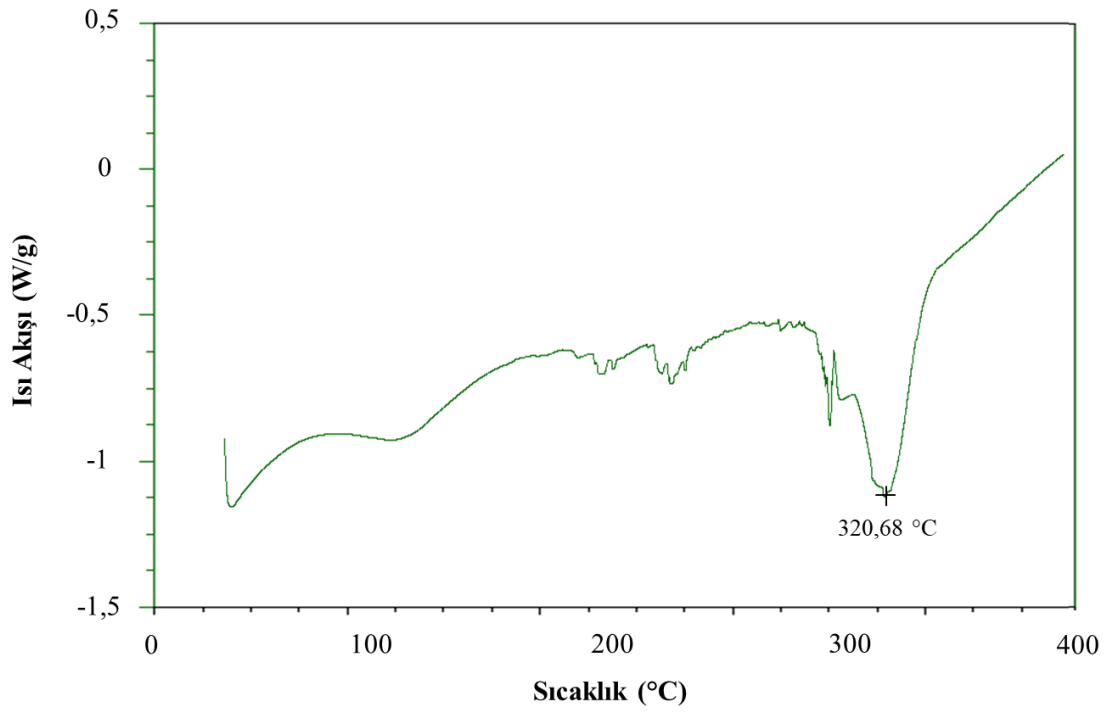
Şekil 4.30. M3-NK'ya ait DSC termogramı.



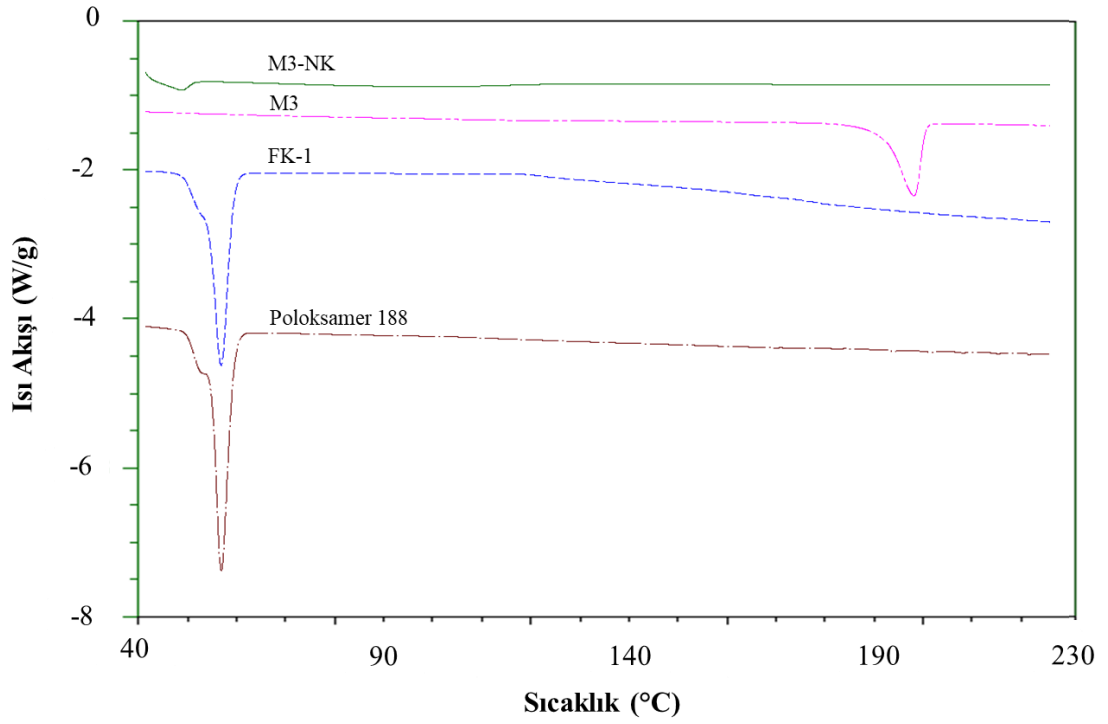
Şekil 4.31. Pullulan'a ait DSC termogramı.



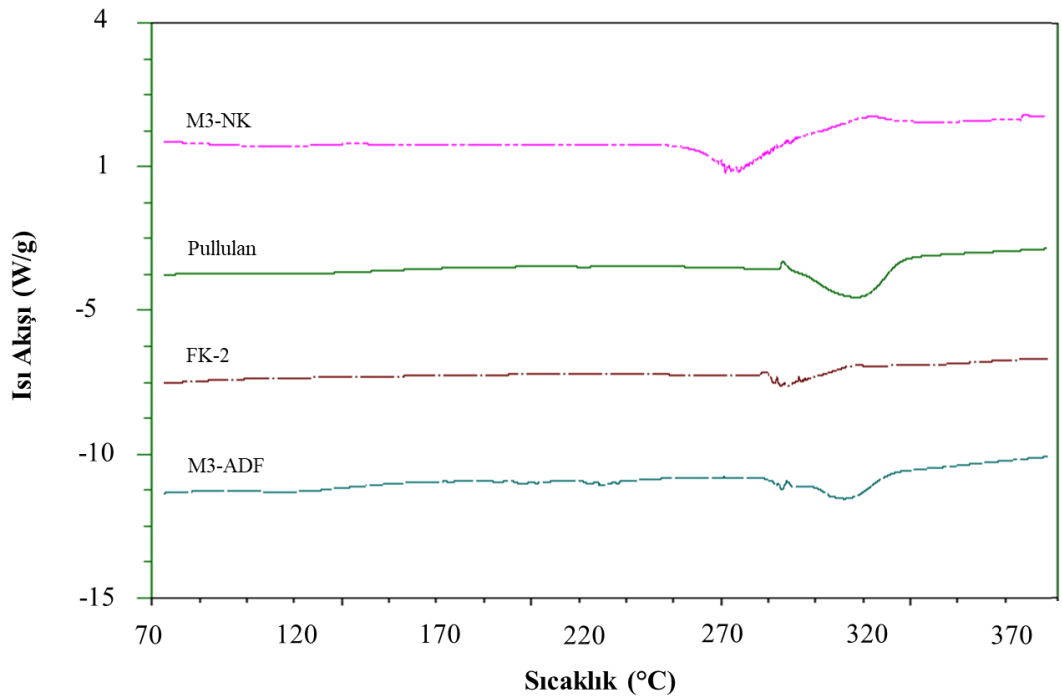
Şekil 4.32. FK-2'ye ait DSC termogramı.



Şekil 4.33. M3-ADF'ye ait DSC termogramı.



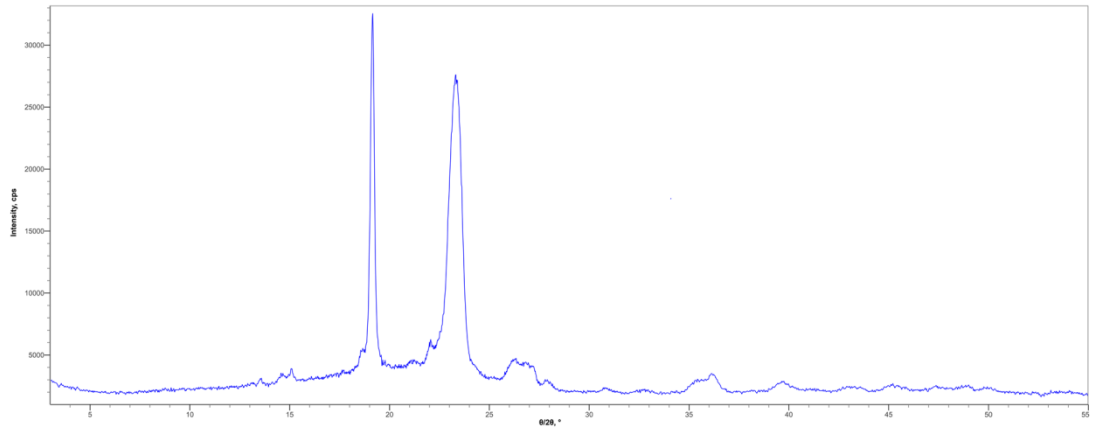
Şekil 4.34. M3, Poloksamer 188, FK-1 ve M3-NK'nın üst üste çakıştırılmış DSC termogramları.



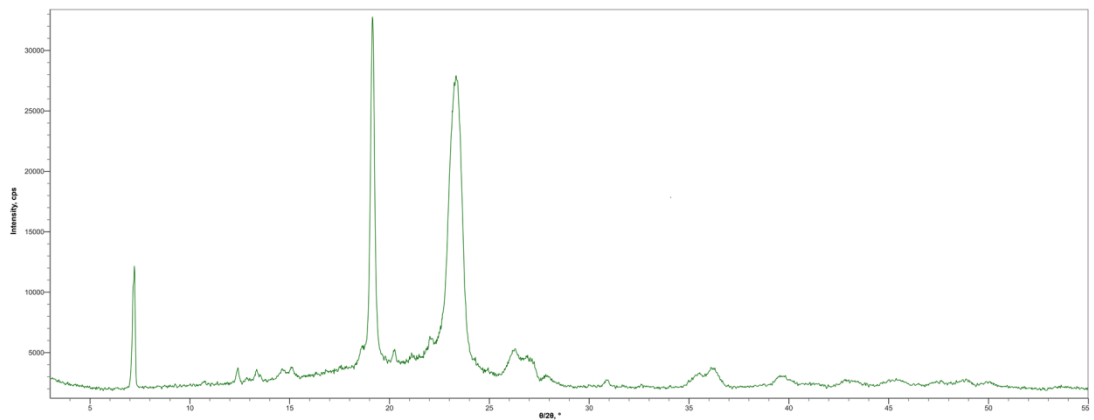
Şekil 4.35. M3-NK, Pullulan, FK-2 ve M3-ADF'nin üst üste çakıştırılmış DSC termogramları.

4.8.3. X-Işını Kırınımı Analizi

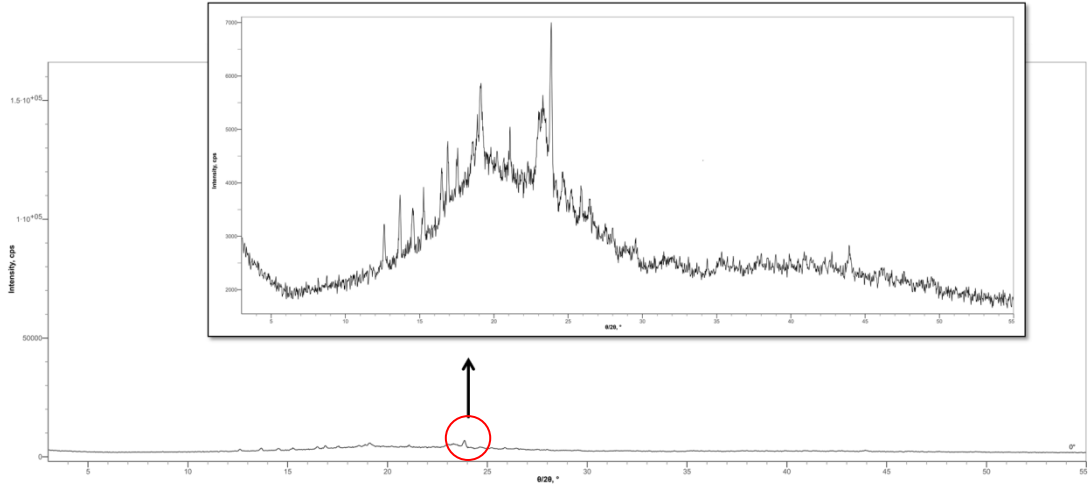
M3-NK ve M3-ADF formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan yardımcı maddelerden poloksamer 188, pullulan, fiziksel karışımlar (FK-1 ve FK-2), M3-NK, M3-ADF'nin XRD analizleri sonucu elde edilen X-ışını kırınımı difraktogramları Şekil 4.36.–Şekil 4.41.'de gösterilmiştir. M3-NK ve M3-ADF formülasyon bileşiminde bulunan ve X-ışını kırınımı difraktogramları ayrı ayrı verilmiş olan analizlerin ve nanosüpsiyonların kurutulmasında kullanılan trehalozun XRD difraktogram pikleri ile FK-2'nin difraktogramının üst üste çakıştırılmış görüntüleri sırasıyla Şekil 4.42., Şekil 4.43. ve Şekil 4.44.'de verilmiştir.



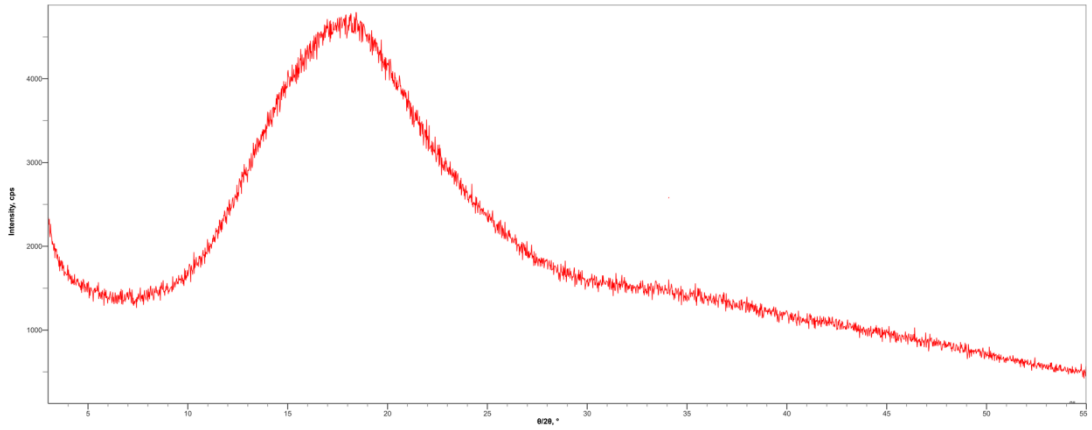
Şekil 4.36. Poloksamer 188'e ait X-ışını kırınımı difraktogramı.



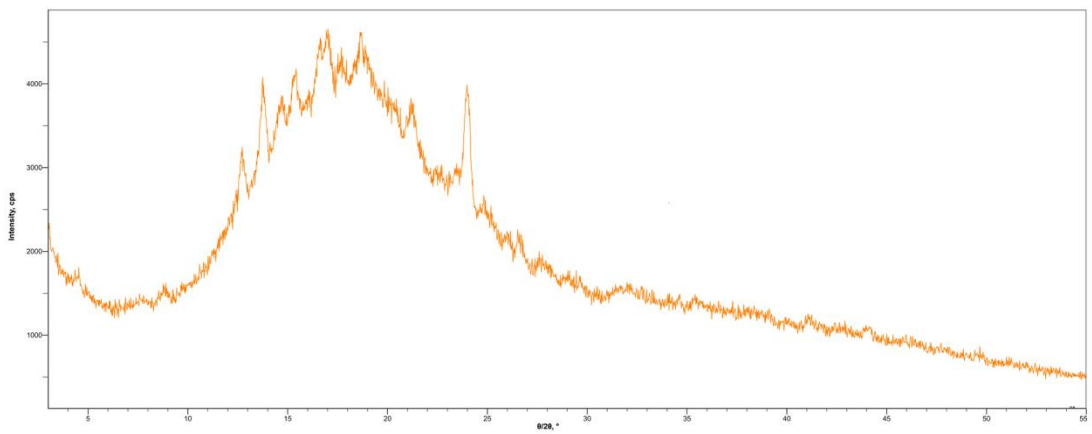
Şekil 4.37. FK-1'e ait X-ışını kırınımı difraktogramı.



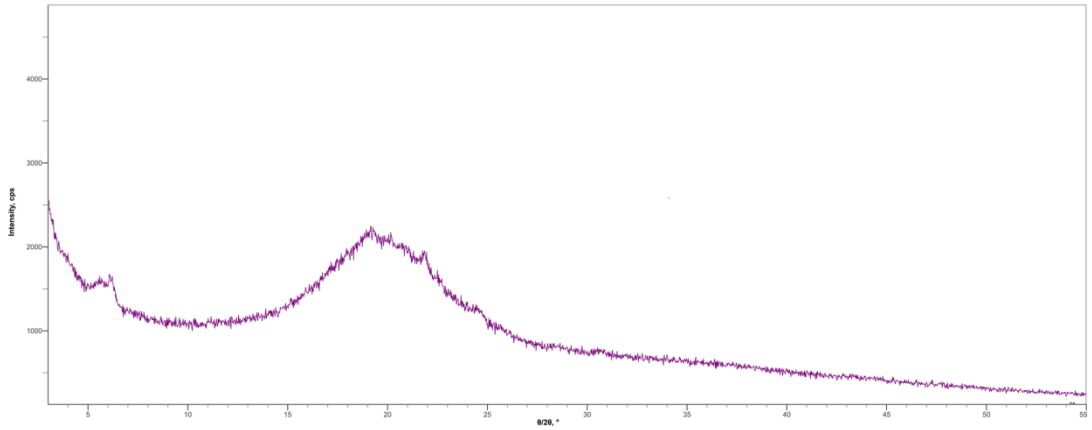
Şekil 4.38. M3-NK'ya ait X-ışını kırınımı difraktogramı.



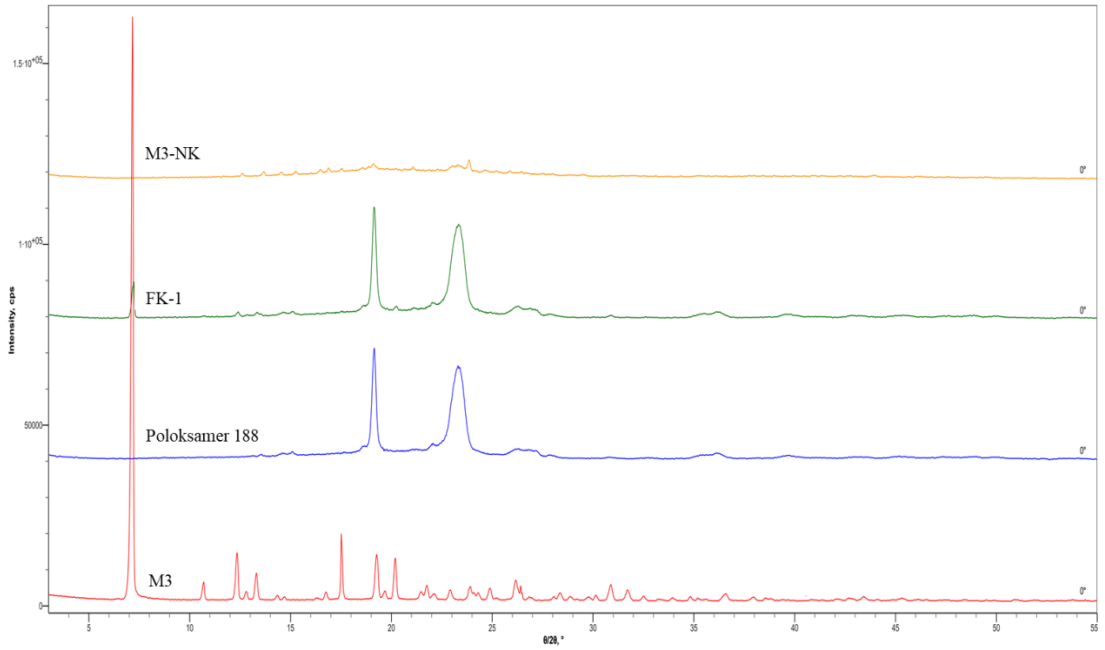
Şekil 4.39. Pullulana ait X-ışını kırınımı difraktogramı.



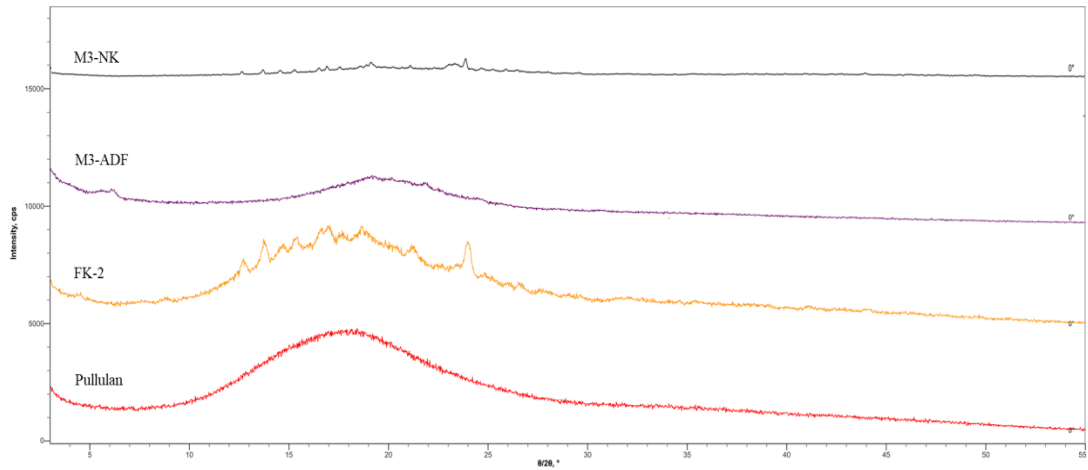
Şekil 4.40. FK-2'ye ait X-ışını kırınımı difraktogramı.



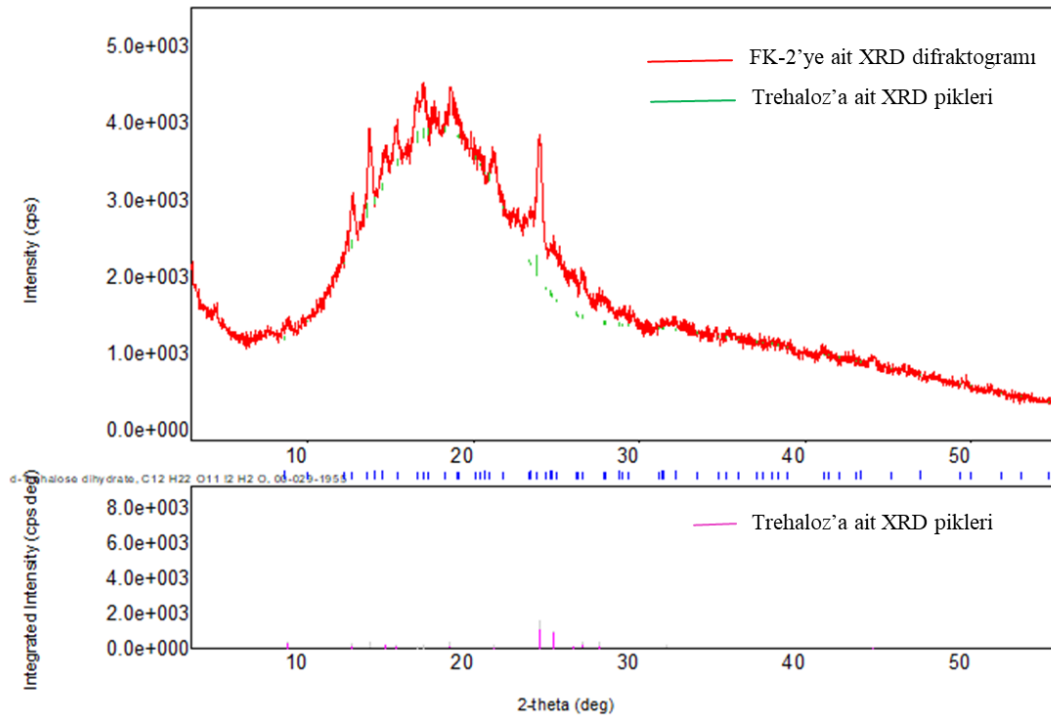
Şekil 4.41. M3-ADF'ye ait X-ışını kırınımı difraktogramı.



Şekil 4.42. M3, Poloksamer 188, FK-1 ve M3-NK'nın üst üste çakıştırılmış X-ışını kırınımı difraktogramları.



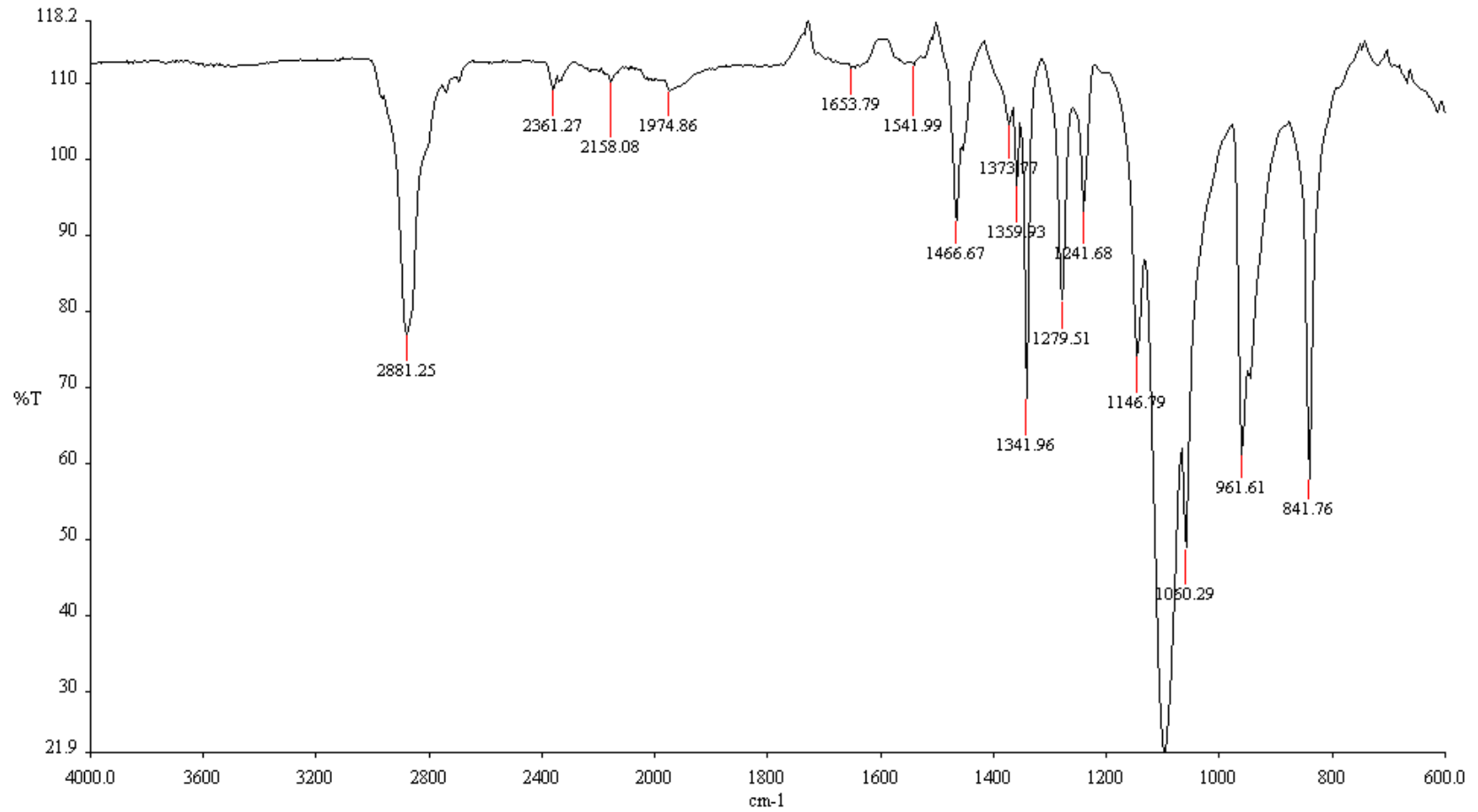
Şekil 4.43. M3-NK, Pullulan, FK-2 ve M3-NK'nin üst üste çakıştırılmış X-ışını kırınımı difraktogramları.



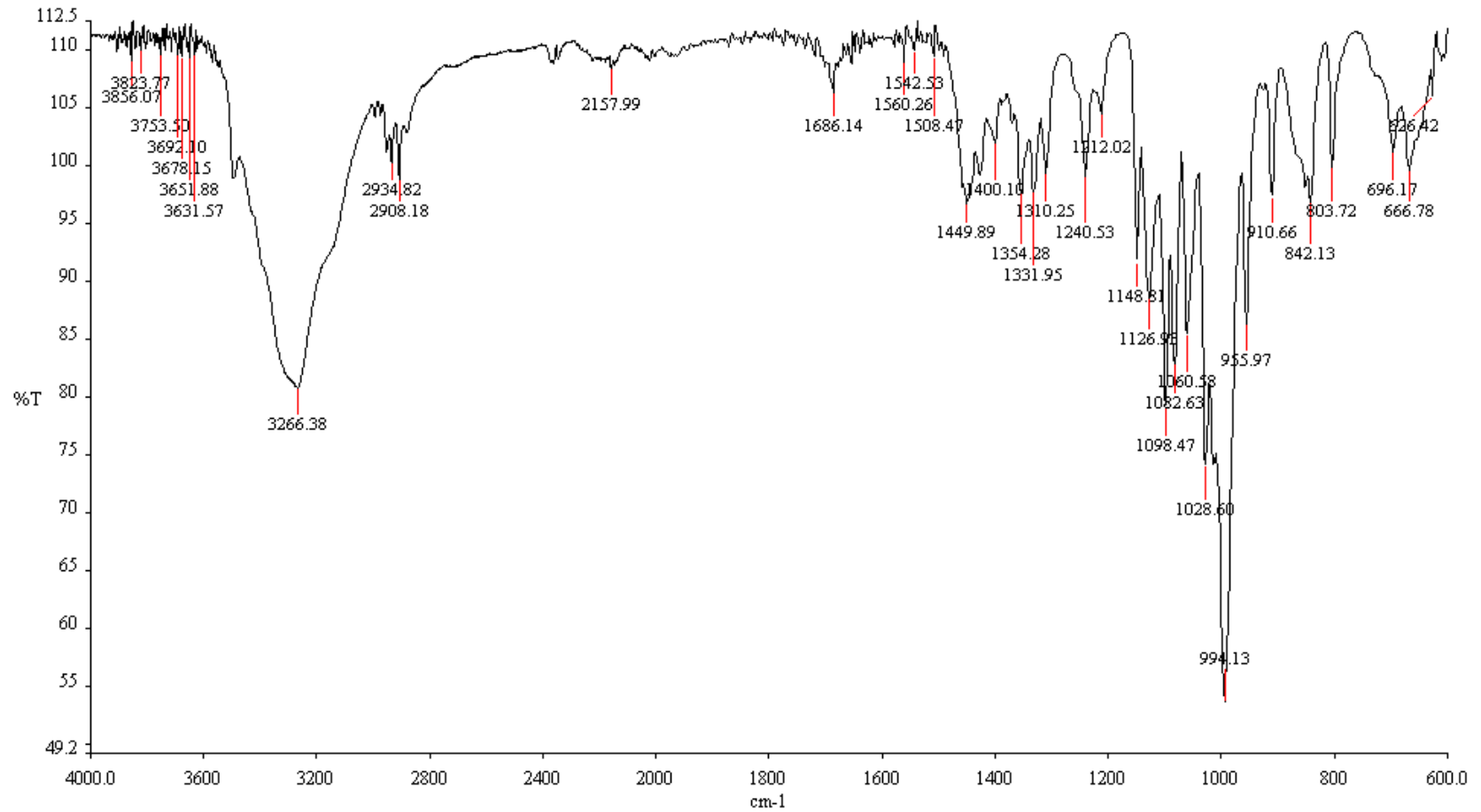
Şekil 4.44. Trehaloza ait X-ışını kırınımı piklerinin FK-2'nin X-ışını kırınımı difraktogramı ile üst üste çakıştırılmış görüntüsü.

4.8.4. Fourier DönüŖümlü Kızılötesi Spektroskopi Analizleri

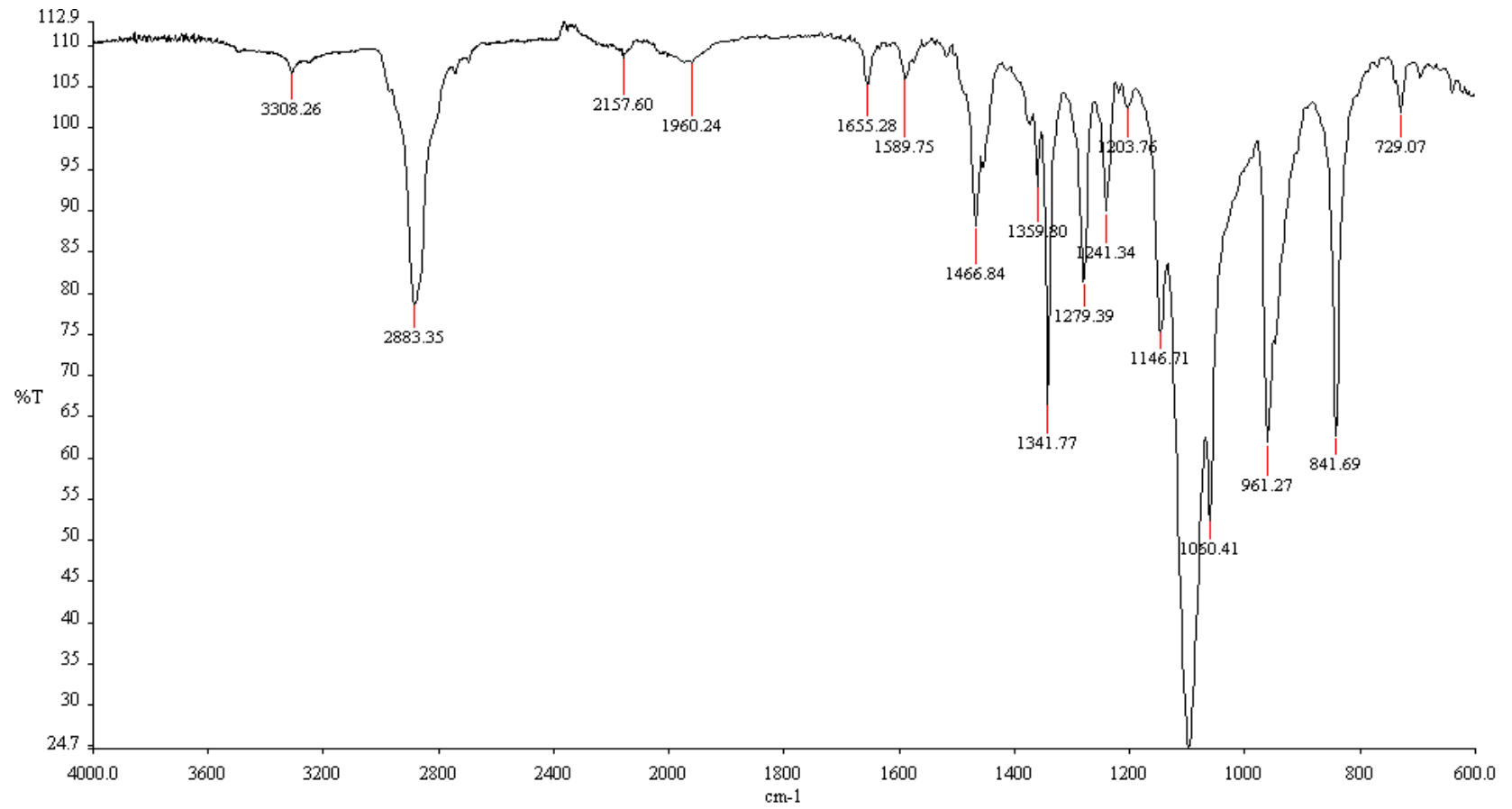
M3-NK ve M3-ADF formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan yardımcı maddelerden poloksamer 188, trehaloz, pullulan, aspartam, fiziksel karışımlar (FK-1 ve FK-2), M3-NK, M3-ADF'nin FT-IR analizleri sonucu elde edilen FT-IR spektrumları Şekil 4.45.–Şekil 4.52.'de gösterilmiştir. M3-NK ve M3-ADF formülasyon bileşiminde bulunan ve FT-IR spektrumları ayrı ayrı verilmiş olan analizlerin üst üste çakıştırılmış görüntüleri ise Şekil 4.53. ve Şekil 4.54.'de verilmiştir.



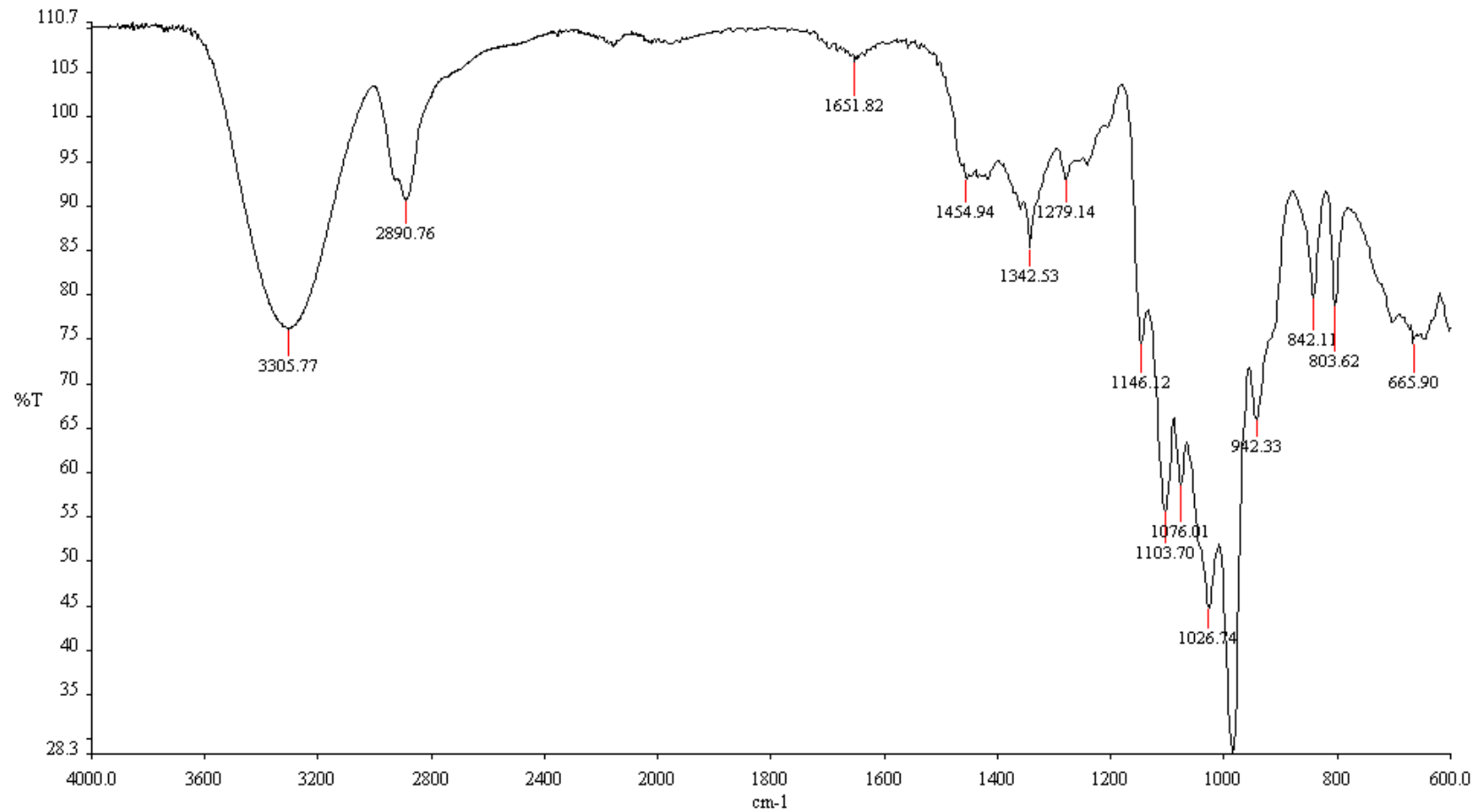
Şekil 4.45. Poloksamer 188'e ait FT-IR spektrumu.



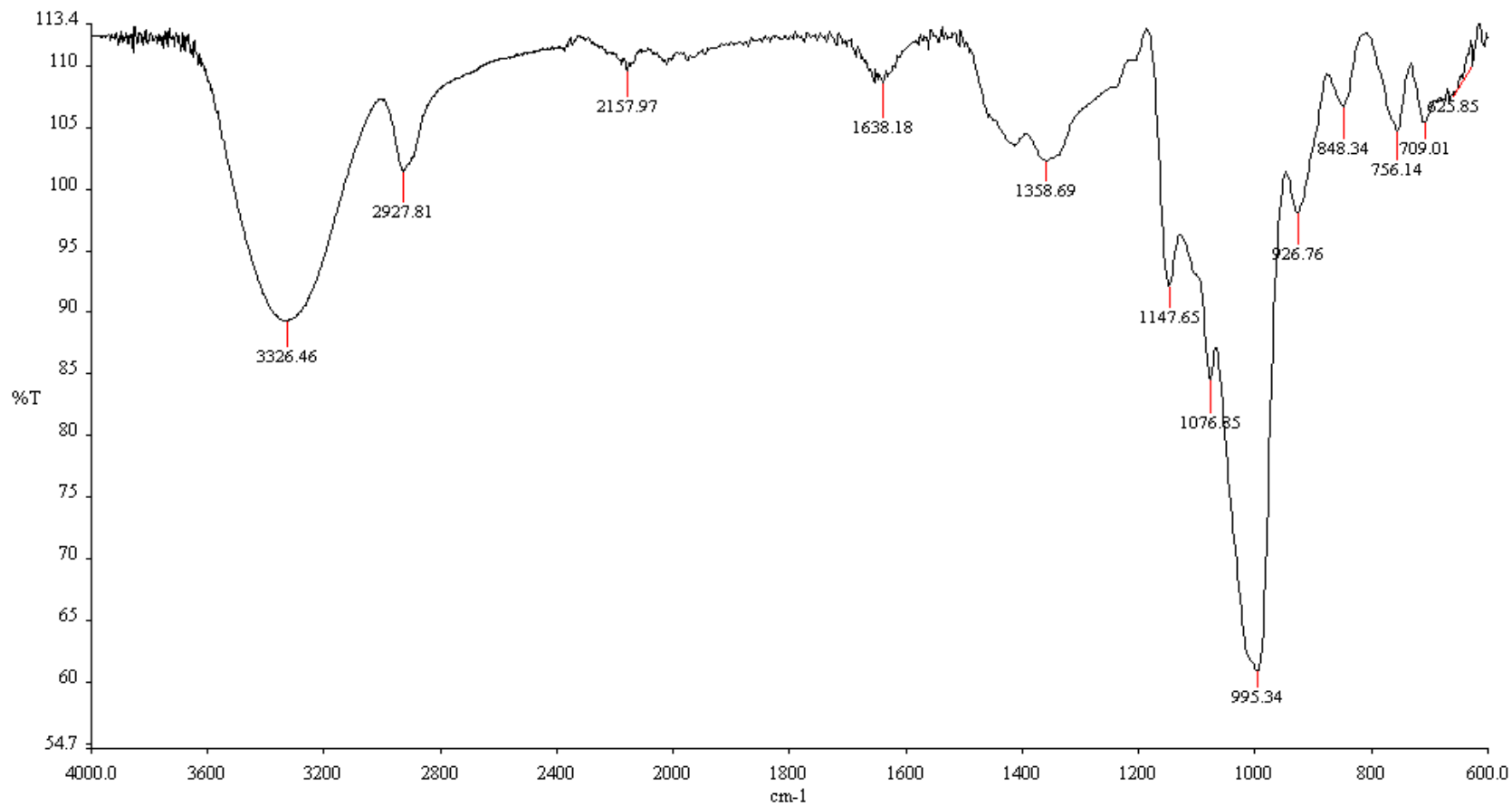
Şekil 4.46. Trehaloz'a ait FT-IR spektrumu.



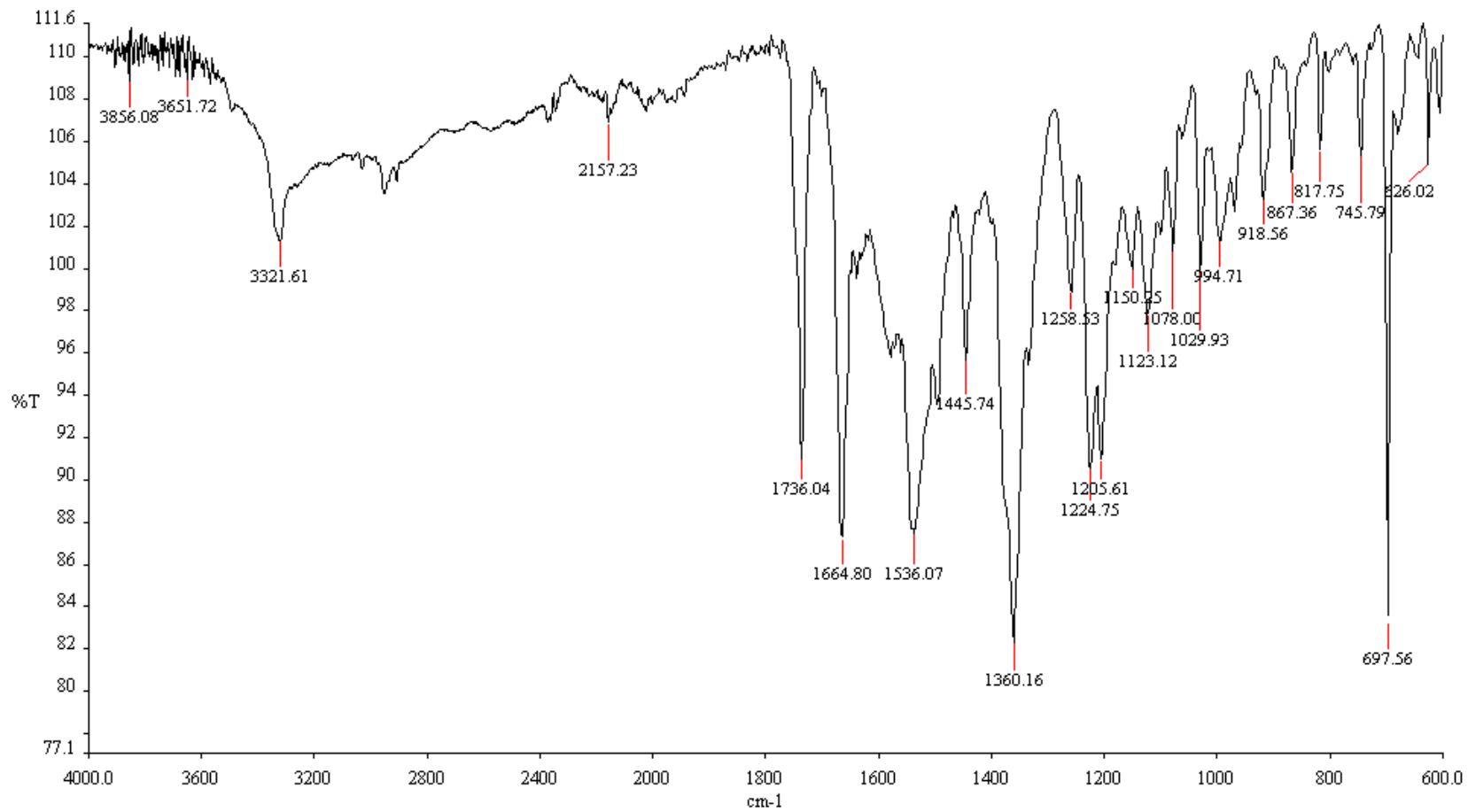
Şekil 4.47. FK-1'e ait FT-IR spektrumu.



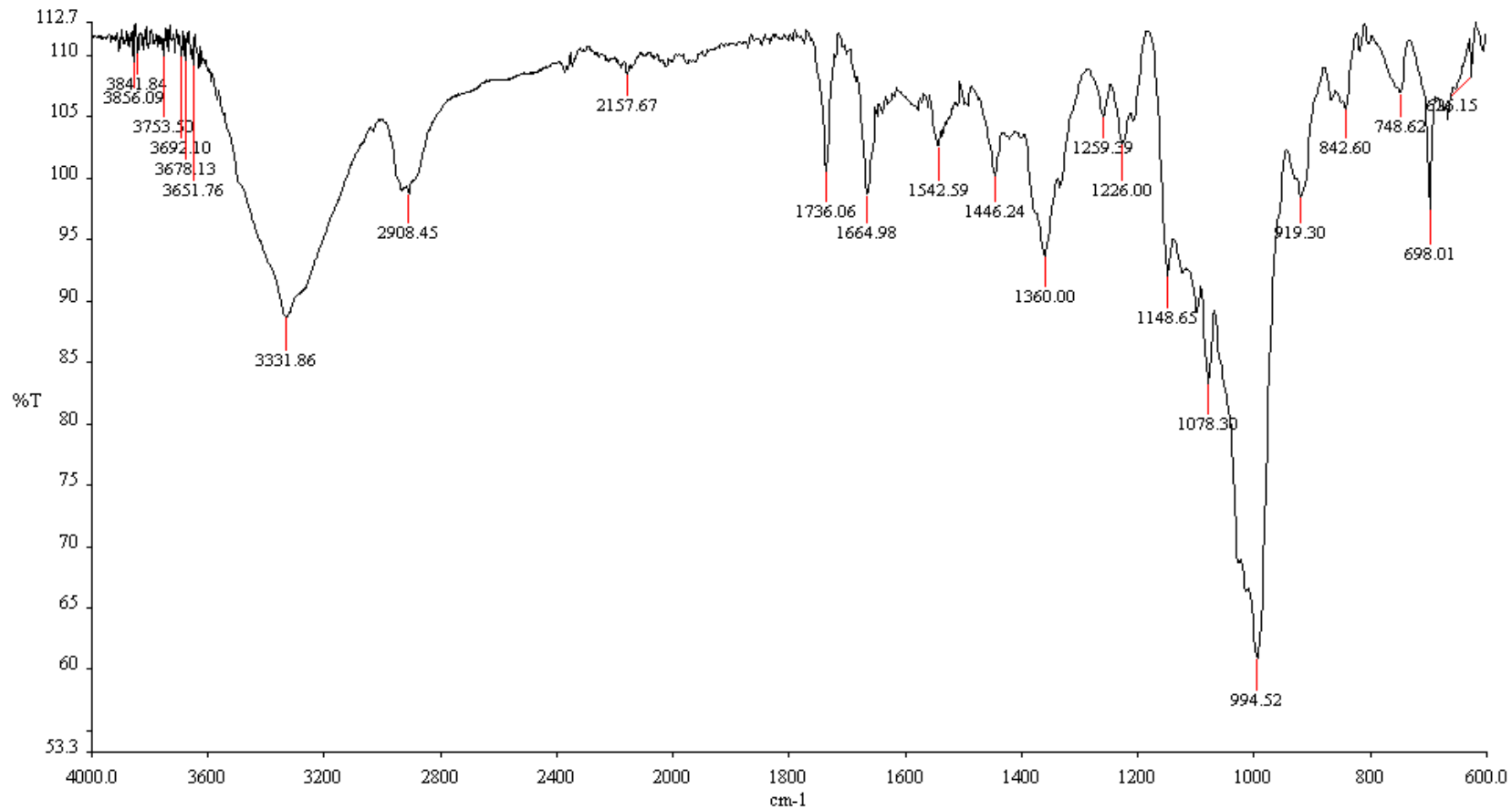
Şekil 4.48. M3-NK'ya ait FT-IR spektrumu.



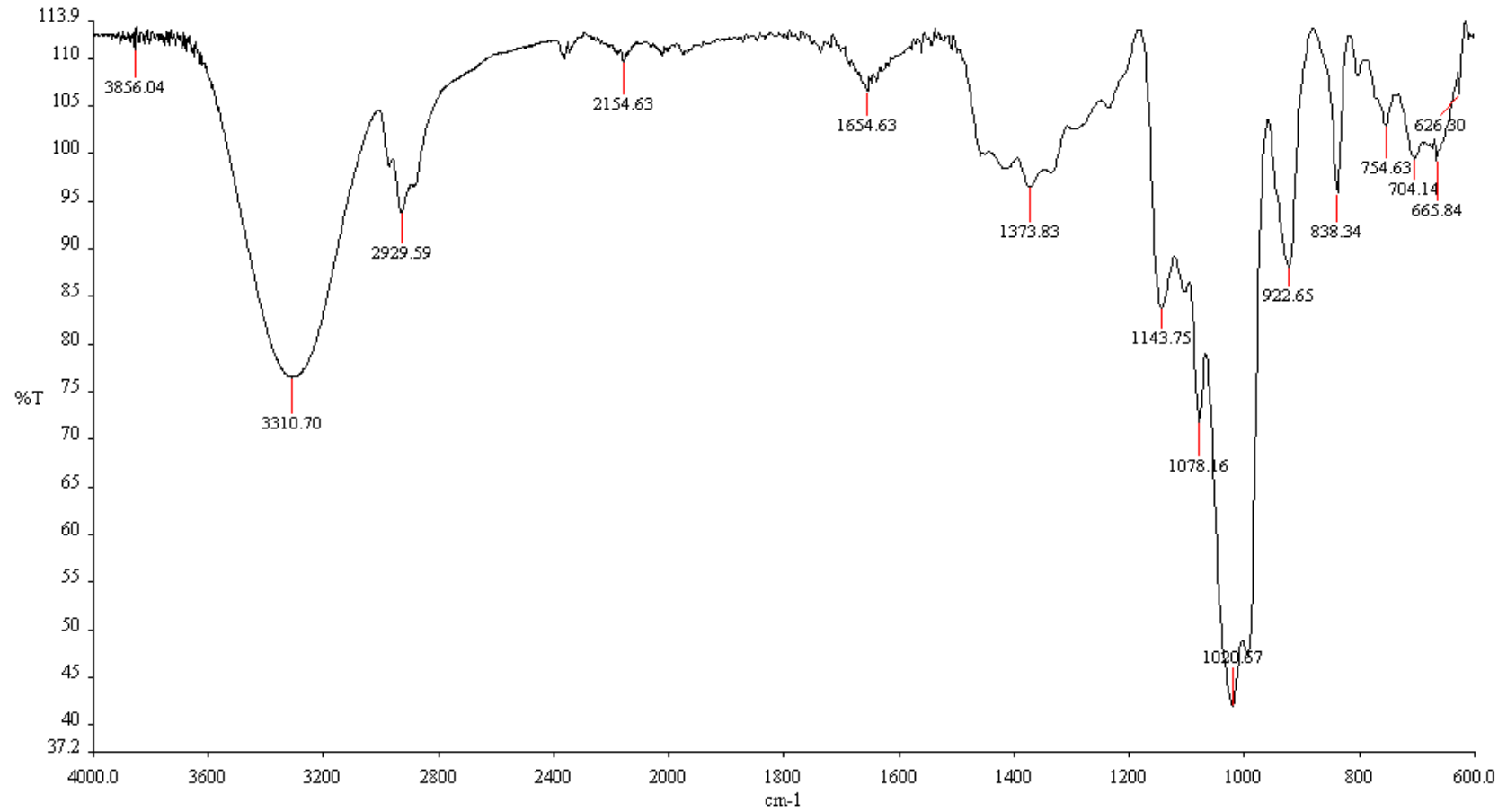
Şekil 4.49. Pullulan'a ait FT-IR spektrumu.



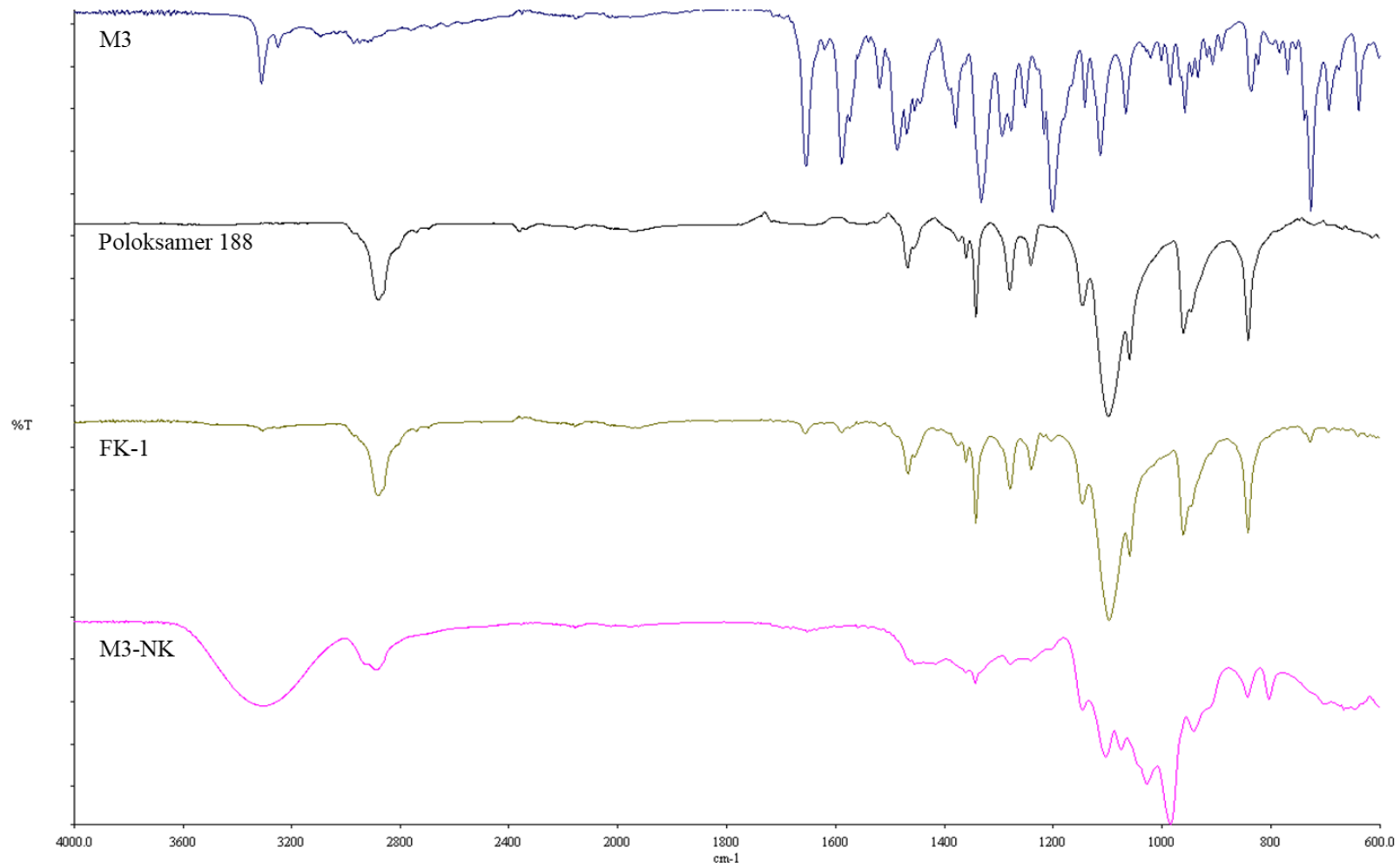
Şekil 4.50. Aspartama ait FT-IR spektrumu.



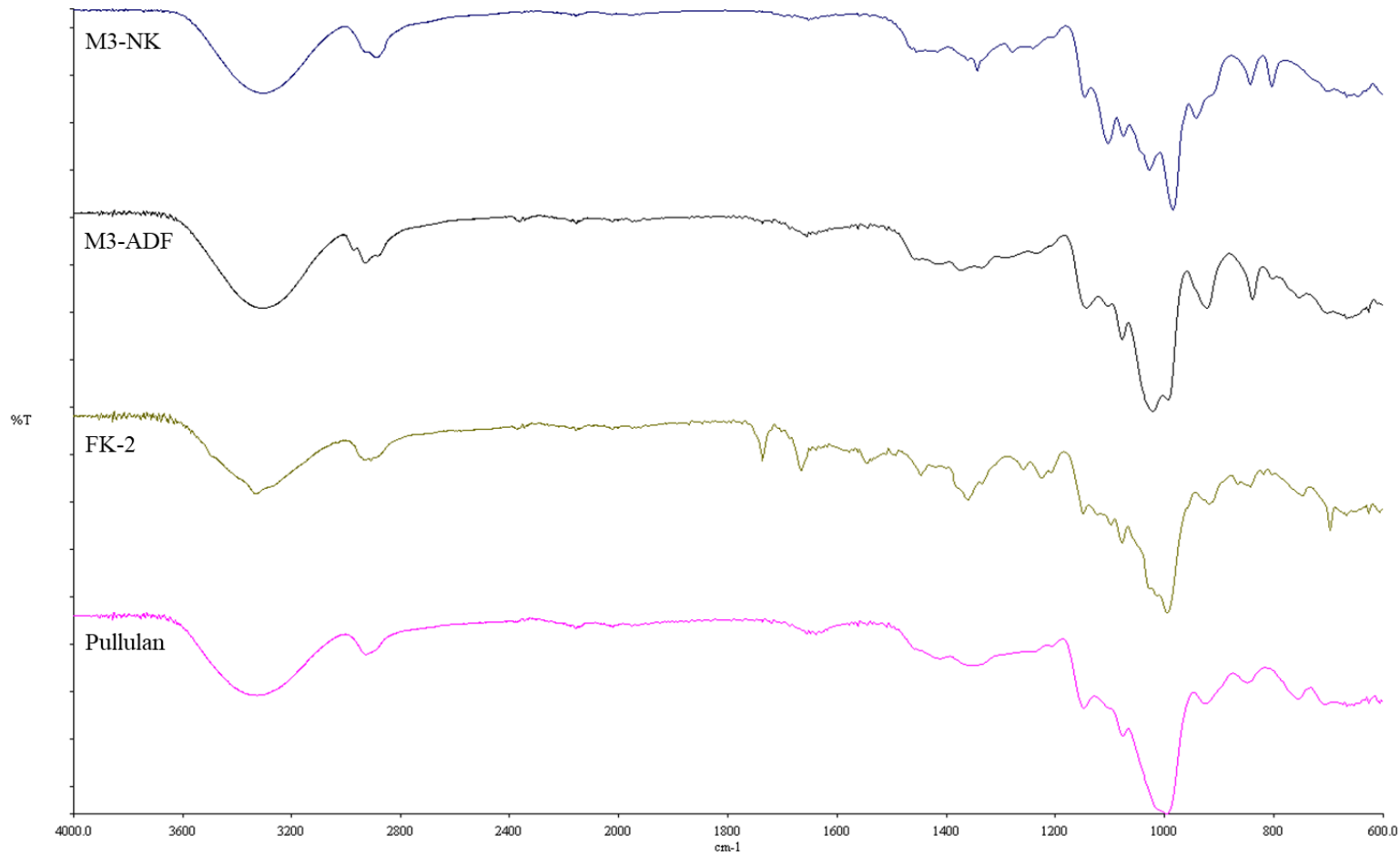
Şekil 4.51. FK-2'ye ait FT-IR spektrumu.



Şekil 4.52. M3-ADF'ye ait FT-IR spektrumu.



Şekil 4.53. M3, Poloksamer 188, FK-1 ve M3-NK'nın üst üste çakıştırılmış FT-IR spektrumları.



Şekil 4.54. M3-NK, Pullulan, FK-2 ve M3-ADF'nin üst üste çakıştırılmış FT-IR spektrumları.

4.9. Stabilite Çalışmaları

ADF'lerin kısa süreli hızlandırılmış stabilite çalışmaları Bölüm 3.2.8.'de belirtildiği şekilde gerçekleştirilmiş ve elde edilen karakterizasyon bulguları Tablo 4.32.'de özetlenmiştir. Stabilite çalışmaları kapsamında M3-ADF'ler kütle tekdüzeliği, kalınlık, yüzey pH'sı, %nem içeriği, içerik tekdüzeliği ve dağılma süresi gibi çeşitli karakterizasyon çalışmaları ile değerlendirilmiş olup elde edilen bulgular Tablo 4.26.–Tablo 4.31. arasında detaylı bir şekilde verilmiştir. Kütle tekdüzeliği çalışmaları haricinde elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. Yapılan morfolojik incelemeler sonucunda M3-ADF formülasyonlarının boyut, renk ve genel görünüşlerinde bir bozulma olmaksızın biraz daha yumuşak ve biraz da yapışkan hale gelmeleri dikkat çekmiştir.

Tablo 4.26. M3-ADF formülasyonlarının kısa süreli hızlandırılmış stabilite çalışmalarına ait kütle tekdüzeliği bulguları ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, %75 nem).

ADF No	0. Gün	15. Gün	30. Gün
	Kuru Film Ağırlığı (mg)	Kuru Film Ağırlığı (mg)	Kuru Film Ağırlığı (mg)
1	78,7	81,8	82,1
2	79,4	80,6	83,3
3	76,8	79,4	81,6
4	79,3	81,7	80,5
5	76,7	81,0	85,7
6	78,5	78,6	82
7	78,0	82,9	80,4
8	79,7	79,9	80,1
9	77,2	79,8	80,8
10	78,9	81,7	80,9
11	77,4	79,2	79,1
12	78,7	78,9	81,2
13	79,1	81,2	81,4
14	79,7	82,4	81,6
15	79,7	77,8	82,3
16	81,0	82,3	84,1
17	79,6	80,9	79,5
18	80,5	83,1	82,1
19	80,9	77,8	82,3
20	81,1	80,8	83,7
Ortalama	79,05	80,59	81,74
SS	1,30	1,57	1,56
% BSS	1,64	1,95	1,91
En düşük	76,7	77,8	79,1
En yüksek	81,1	83,1	85,7
Alt sınır	71,2	74,5	75,6
Üst sınır	87,0	86,6	87,9

Tablo 4.27. M3-ADF formülasyonlarının kısa süreli hızlandırılmış stabilite çalışmalarına ait ortalama kalınlık bulguları ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, %75 nem).

ADF No	0. Gün Ortalama film kalınlığı (mm)	15. Gün Ortalama film kalınlığı (mm)	30. Gün Ortalama film kalınlığı (mm)
1	0,133	0,131	0,135
2	0,129	0,132	0,129
3	0,132	0,133	0,131
4	0,129	0,135	0,126
5	0,126	0,128	0,131
6	0,127	0,131	0,127
7	0,129	0,128	0,128
8	0,128	0,129	0,127
9	0,132	0,126	0,131
10	0,125	0,130	0,132
Ortalama	0,129	0,130	0,130
SS	0,003	0,002	0,003
% BSS	1,989	1,853	1,946

Tablo 4.28. M3-ADF formülasyonlarının kısa süreli hızlandırılmış stabilite çalışmalarına ait yüzey pH bulguları ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, %75 nem).

ADF No	0. Gün pH Değeri	15. Gün pH Değeri	30. Gün pH Değeri
1	6,31	6,22	6,01
2	6,14	6,20	6,18
3	6,20	6,24	6,23
4	6,45	6,15	6,25
5	6,29	6,19	6,30
6	6,33	6,33	6,14
Ortalama	6,29	6,22	6,19
SS	0,10	0,06	0,09
% BSS	1,57	0,95	1,51

Tablo 4.29. M3-ADF formülasyonlarının kısa süreli hızlandırılmış stabilite çalışmalarına ait ortalama içerik tekdüzeliği bulguları ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, %75 nem).

ADF No	0. Gün İçerik Tekdüzeliliği (%)	15. Gün İçerik Tekdüzeliliği (%)	30. Gün İçerik Tekdüzeliliği (%)
1	92,39	96,34	94,39
2	97,48	90,46	93,38
3	92,06	90,99	103,41
4	95,93	95,98	98,72
5	94,88	90,72	92,92
6	95,22	95,22	93,26
7	102,84	96,99	96,99
8	93,56	95,51	91,61
9	91,96	92,15	90,01
10	97,28	95,33	97,28
Ortalama	95,36	93,97	95,20
SS	3,15	2,44	3,74
% BSS	3,3	2,60	3,93

Tablo 4.30. M3-ADF formülasyonlarının kısa süreli hızlandırılmış stabilite çalışmalarına ait distile su ortamında yapılan dağılma testi bulguları ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, %75 nem).

ADF No	Dağılma Süresi (sn)								
	Petri Kabı Yöntemi						Damla Yöntemi		
	ADF'in			ADF'in					
	Dağılmaya Başladığı Süre			Tamamen Kaybolduğu Süre					
0.gün	15.gün	30.gün	0.gün	15.gün	30.gün	0.gün	15.gün	30.gün	
1	5	5	5	20	18	18	12	11	11
2	3	4	3	17	21	19	14	12	12
3	6	5	6	23	19	21	14	13	14
4	4	3	5	22	17	17	11	10	13
5	5	3	4	19	23	20	12	11	9
6	3	4	4	27	25	21	13	10	10
Ortalama	4,3	4	4,5	21,3	20,5	19,3	12,7	11,2	11,5
SS	1,1	0,8	0,9	3,2	2,8	1,5	1,1	1,1	1,7

Tablo 4.31. M3-ADF formülasyonlarının kısa süreli hızlandırılmış stabilite çalışmalarına ait pH 5,7 yapay tükürük sıvısı ortamında yapılan dağılma testi bulguları ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, %75 nem).

ADF No	Dağılma Süresi (sn)								
	Petri Kabı Yöntemi						Damla Yöntemi		
	ADF'in			ADF'in					
	Dağılmaya Başladığı Süre			Tamamen Kaybolduğu Süre					
0.gün	15.gün	30.gün	0.gün	15.gün	30.gün	0.gün	15.gün	30.gün	
1	6	7	4	23	22	20	12	13	12
2	5	3	6	21	21	22	14	12	10
3	8	7	7	24	19	18	14	14	13
4	8	6	5	26	23	20	13	11	9
5	7	4	4	19	22	21	12	12	15
6	5	7	3	25	24	24	15	14	16
Ortalama	6,5	5,7	4,8	23	21,8	20,8	13,3	12,7	12,5
SS	1,3	1,6	1,3	1,2	1,6	1,9	0,5	1,1	2,5

Table 4. 32. M3-ADF formülasyonlarının kısa süreli hızlandırılmış stabilite çalışma bulguları ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, %75 nem, Ortalama \pm SS).

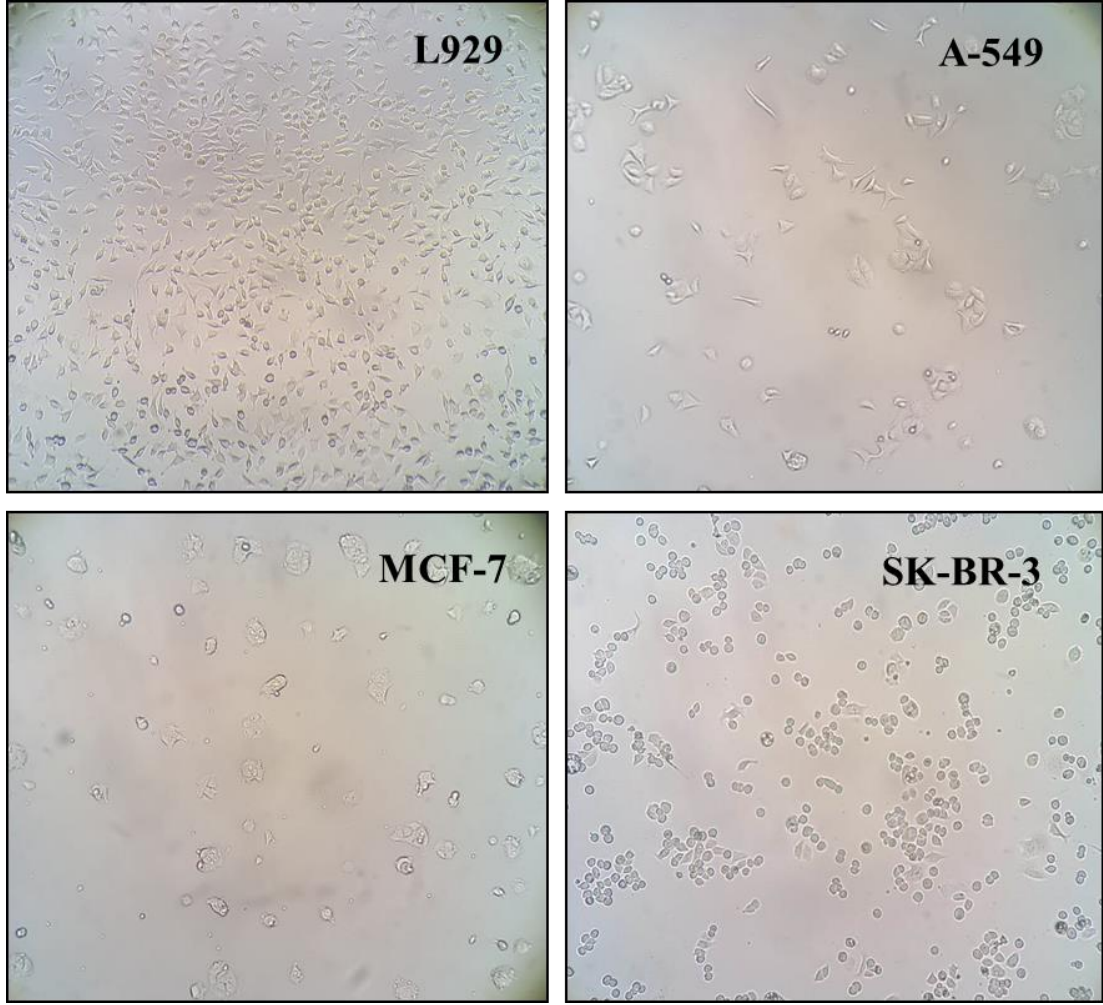
KARAKTERİZASYON	GÜN			
	0.Gün	15.Gün	30.Gün	
Görünüş	Şeffaf	Şeffaf	Şeffaf	
	Pürüzsüz	Pürüzsüz	Pürüzsüz	
	Homojen	Homojen	Homojen	
	Tam kuru	Yapışkan	Yapışkan	
*Ağırlık (mg, n=20)	79,05 \pm 1,3	80,59 \pm 1,6	81,74 \pm 1,6	
Kalınlık (mm, n=10)	0,129 \pm 0,003	0,130 \pm 0,002	0,130 \pm 0,003	
Yüzey pH (n=6)	6,29 \pm 0,1	6,22 \pm 0,1	6,19 \pm 0,1	
Nem içeriği (% , n=13)	6,58	6,72	6,92	
İçerik Tekdüzeliliği (% , n=10)	95,36 \pm 3,2	93,97 \pm 2,4	95,20 \pm 3,7	
Dağılma süresi (sn) (Distile su)	Damla Yöntemi	12,7 \pm 1,1	11,2 \pm 1,1	11,5 \pm 1,7
	Petri Kabı Yöntemi	21,3 \pm 3,2	20,5 \pm 2,8	19,3 \pm 1,5
Dağılma süresi (sn) (pH 5,7 Yapay tükürük sıvısı)	Damla Yöntemi	13,3 \pm 0,5	12,7 \pm 1,1	12,5 \pm 2,5
	Petri Kabı Yöntemi	23,0 \pm 1,2	21,8 \pm 1,6	20,8 \pm 1,9

*İstatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0,05$).

4.10. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.10.1. Hücre Kültürü Çalışmaları İçin Hücrelerin Hazırlanması

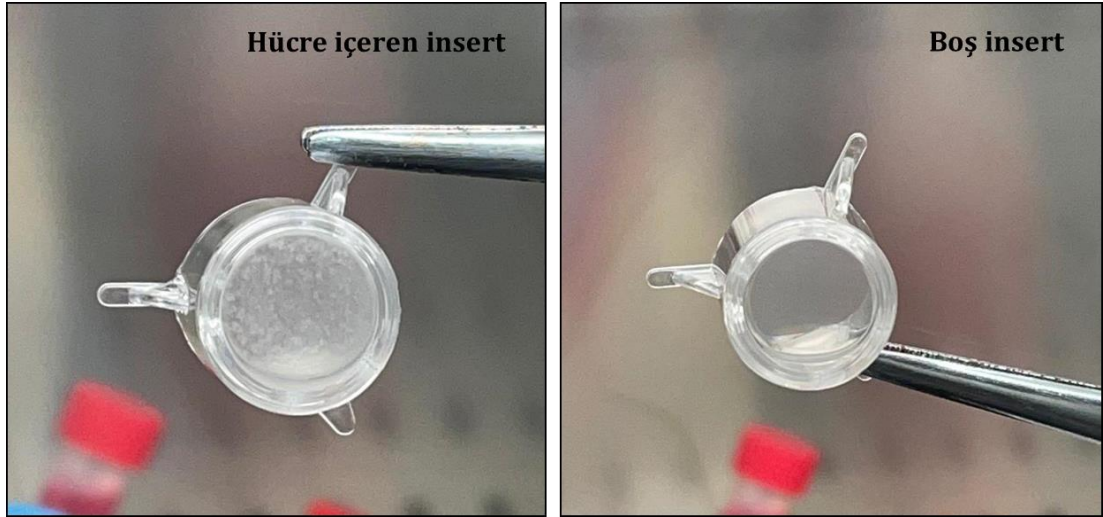
L929, MCF-7, SK-BR-3 ve A549 hücrelerinin kültür ortamında 96 kuyucuklu plakalara ekimi sırasında inverted mikroskop ile çekilen mikrografları Şekil 4.55.'de verilmiştir.



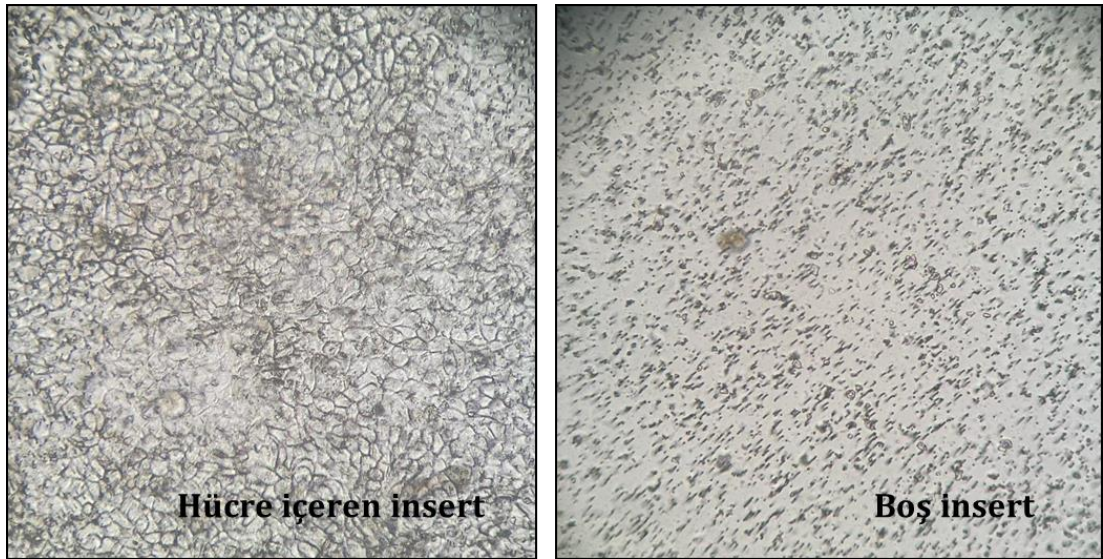
Şekil 4.55. Kültür ortamı içinde L929, MCF-7, SK-BR-3 ve A-549 hücrelerinin mikrografları (10x).

4.10.2. İn Vitro Geçirgenlik (Permeabilite) Çalışmaları İçin Caco-2 Hücrelerinin Hazırlanması

İn vitro permeabilite çalışmalarının yapıldığı 21. gündeki boş insert ve hücre içeren insert görüntüleri Şekil 4.56.'da ve inverted mikroskop ile çekilen mikrografları Şekil 4.57.'de gösterilmiştir. Genel olarak boş insertlerde porlu yapı dikkat çekmekte iken, hücre içeren insertlerde Caco-2 hücrelerinin insert yüzeyini tamamen kapladığı görülmektedir. Tek tabaka hücre bütünlüğünün değerlendirilmesi amacıyla tüm insertlerin TEER değerleri ölçülmüştür. Genel olarak Caco-2 hücre tek tabakalarının TEER değerleri 200-1000 ohm.cm² olarak ölçülmüş olup TEER<400 ohm.cm² olan hücreler transport çalışmalarında kullanılmamıştır.



Şekil 4.56. İn vitro permeabilite çalışmalarında kullanılan boş ve hücre içeren insert görüntüleri.



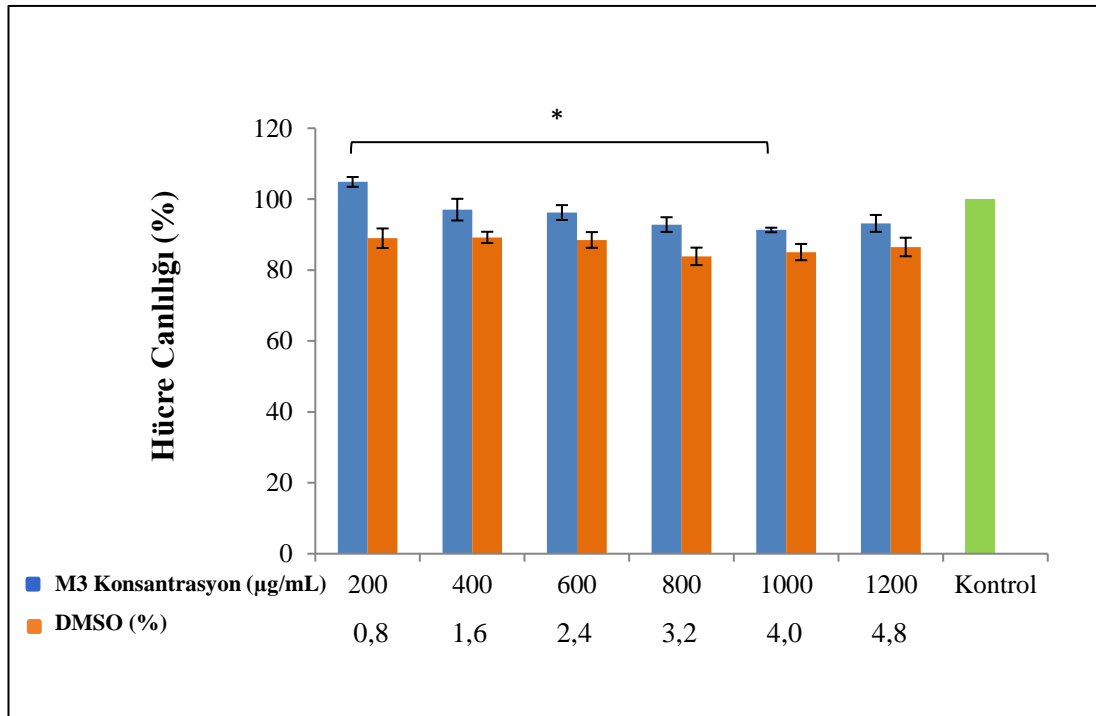
Şekil 4.57. İn vitro permeabilite çalışmalarında kullanılan boş ve hücre içeren insert mikrografları (40x).

4.10.3. M3'ün Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi'ndeki Yerinin Tespiti İçin Yapılan Ön Deneme Sonuçları

M3'ün permeabilite çalışmalarında kullanılacak güvenli dozun belirlenmesi amacıyla yapılan sitotoksosite çalışma bulguları ve DMSO kontrollerine ait sitotoksosite bulguları Tablo 4.33.'de verilmiştir. Seçilen konsantrasyon aralığında M3'ün Caco-2 hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksosite profili ve DMSO kontrollerine ait sitotoksosite profili Şekil 4.58.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.33. M3'ün Caco-2 hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksosite çalışma bulguları (Ortalama \pm SH; n=3).

Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Hücre Canlılığı (%)		DMSO (%)
	M3	DMSO	
200	104,9 \pm 1,4	90,0 \pm 2,8	0,8
400	97,0 \pm 3,1	89,2 \pm 1,6	1,6
600	96,2 \pm 2,1	88,5 \pm 2,2	2,4
800	92,8 \pm 2,1	83,9 \pm 2,5	3,2
1000	91,3 \pm 0,6	85,1 \pm 2,3	4,0
1200	93,2 \pm 2,4	86,5 \pm 2,6	4,8



Şekil 4.58. M3'ün ve DMSO kontrollerinin Caco-2 hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksosite profili (Ortalama \pm SH; n=3) (* $p < 0,05$, farklı konsantrasyonlarla karşılaştırıldığında).

M3'ün in vitro permeabilite ön çalışmaları için tespit edilen bazolateral kompartman konsantrasyonu ve P_{app} değerleri Tablo 4.34.'de verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre M3 için ortalama permeabilite katsayısı $2,17 (\pm 0,07) \times 10^{-7}$ cm/sn olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.34. M3'ün in vitro permeabilite ön çalışma bulguları.

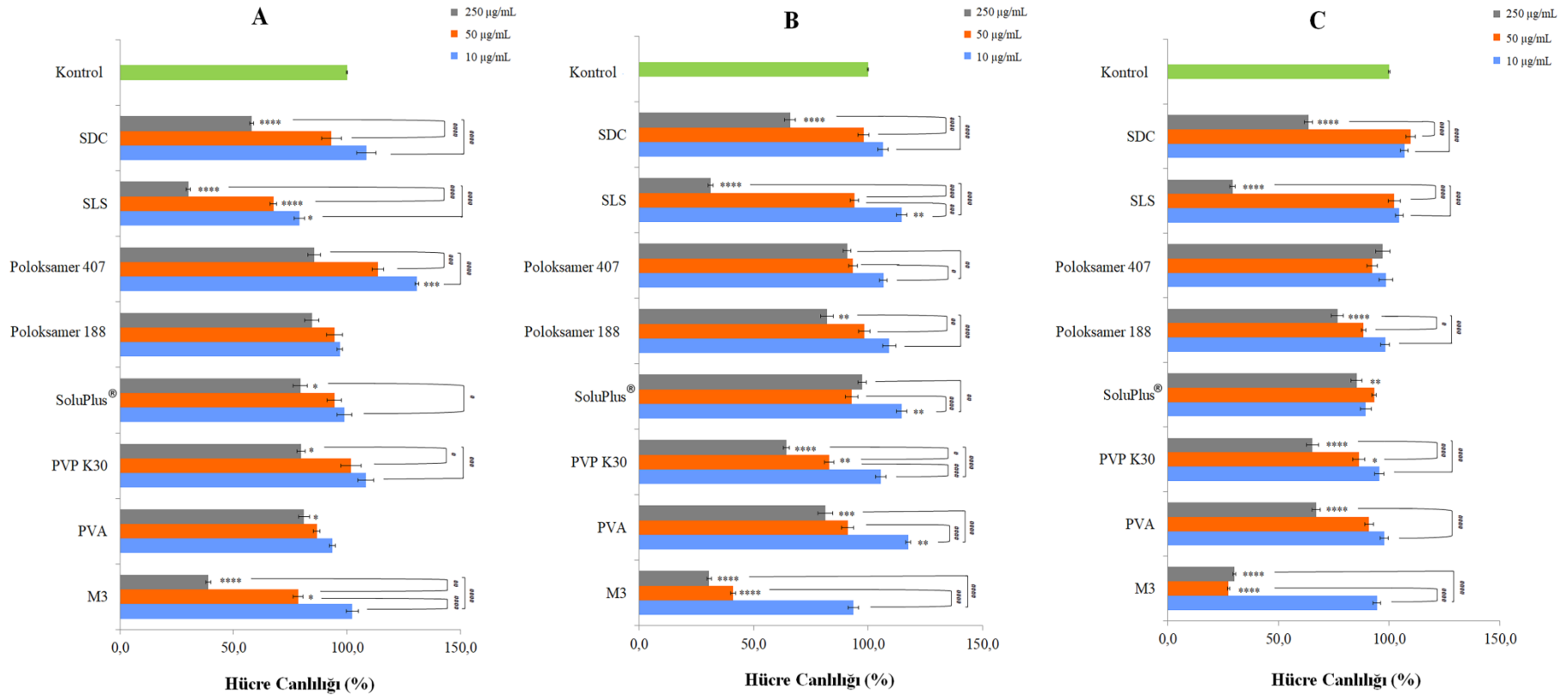
İnsert No	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	P_{app} Değeri x 10^{-7} (cm/sn)
1	0,632	2,15
2	0,626	2,13
3	0,653	2,23
4	0,615	2,10
5	0,622	2,12
6	0,674	2,30
Ortalama	0,637	2,17
SS	0,02	0,07
% BSS	3,21	3,20

4.10.4. Farklı Stabilizanların M3 Nanosüspansiyon Formülasyonlarının İn Vitro Sitotoksosite Profili Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

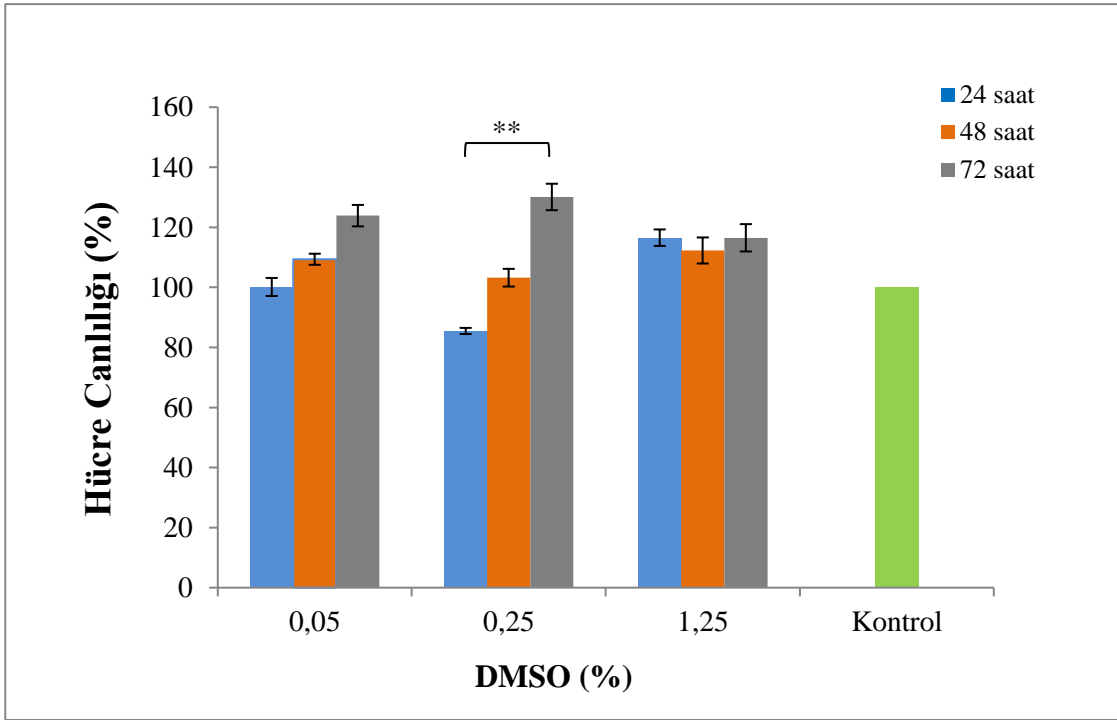
NKT ile geliştirilmiş çözünürlük özelliklerine sahip M3 nanosüspansiyonlarında kullanılan stabilizanların formülasyonların in vitro sitotoksosite profili üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla yapılan sitotoksosite çalışma bulguları ve DMSO kontrollerine ait sitotoksosite bulguları Tablo 4.35.'de verilmiştir. M3 ve %0,5 stabilizan içeren M3 nanosüspansiyon formülasyonlarının ve DMSO kontrollerinin in vitro sitotoksosite profilleri ise Şekil 4.59. ve Şekil 4.60.'da gösterilmiştir.

Tablo 4.35. M3, %0,5 stabilizan içeren M3 nanosüspansiyon formülasyonları ve DMSO kontrollerinin sitotoksosite çalışma bulguları (Ortalama \pm SH; n=3).

Örnek	Hücre Canlılığı (%)								
	24 saat			48 saat			72 saat		
	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$) – DMSO (%)			Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$) – DMSO (%)			Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$) – DMSO (%)		
	10 – 0,05	50 – 0,25	250 – 1,25	10 – 0,05	50 – 0,25	250 – 1,25	10 – 0,05	50 – 0,25	250 – 1,25
M3	102,4 \pm 2,7	78,5 \pm 2,2	38,9 \pm 1,2	93,7 \pm 2,3	41,0 \pm 1,1	30,5 \pm 1,0	94,5 \pm 1,7	27,5 \pm 0,6	30,1 \pm 0,5
PVA-NS	93,6 \pm 1,4	86,7 \pm 1,4	81,0 \pm 2,4	117,6 \pm 1,2	91,1 \pm 2,7	81,3 \pm 3,3	97,7 \pm 1,9	91,0 \pm 2,0	67,1 \pm 1,9
PVP K30-NS	108,3 \pm 3,5	101,9 \pm 4,4	81,6 \pm 2,4	105,5 \pm 2,3	83,1 \pm 2,0	70,7 \pm 2,2	95,5 \pm 2,1	86,3 \pm 2,7	58,7 \pm 2,7
SoluPlus®- NS	98,9 \pm 3,3	94,5 \pm 3,1	79,4 \pm 3,2	114,7 \pm 2,2	92,9 \pm 2,7	97,4 \pm 1,9	89,5 \pm 2,4	93,2 \pm 1,1	85,3 \pm 2,4
Poloksamer 188-NS	96,9 \pm 1,2	94,5 \pm 3,5	84,6 \pm 3,2	109,3 \pm 2,8	98,4 \pm 2,6	82,1 \pm 2,8	98,2 \pm 1,9	88,5 \pm 1,0	80,0 \pm 2,4
Poloksamer 407-NS	130,8 \pm 0,8	113,6 \pm 2,6	85,5 \pm 2,7	106,7 \pm 1,7	93,4 \pm 1,9	90,9 \pm 1,7	98,5 \pm 3,1	92,4 \pm 2,4	97,1 \pm 3,2
SLS-NS	79,0 \pm 2,2	67,6 \pm 1,4	30,1 \pm 1,0	114,7 \pm 2,2	94,0 \pm 1,8	31,3 \pm 1,0	104,6 \pm 1,7	102,3 \pm 2,7	29,3 \pm 1,3
SDC-NS	108,6 \pm 4,2	93,2 \pm 4,3	58,0 \pm 0,9	106,6 \pm 2,3	98,1 \pm 2,4	65,9 \pm 2,3	106,8 \pm 1,6	109,7 \pm 2,2	63,7 \pm 1,8
DMSO Kontrol	100,1 \pm 3,0	85,5 \pm 1,0	116,5 \pm 2,7	109,4 \pm 1,8	103,2 \pm 3,0	112,3 \pm 4,3	123,9 \pm 3,6	130,1 \pm 4,4	116,5 \pm 4,5



Şekil 4.59. M3'ün ve %0,5 stabilizan içeren M3 nanosüspansiyon formülasyonlarının 24 saat (A), 48 saat (B) ve 72 saat (C) inkübasyondan sonra L929 hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksosite profilleri (Ortalama \pm SH; n=3) (*p<0,05, ** p<0,005, ***p<0,001, ****p<0,0001, kontrol ile karşılaştırıldığında; #p<0,05, ##p<0,005, ###p<0,001, ####p<0,0001, farklı konsantrasyonlarla karşılaştırıldığında).



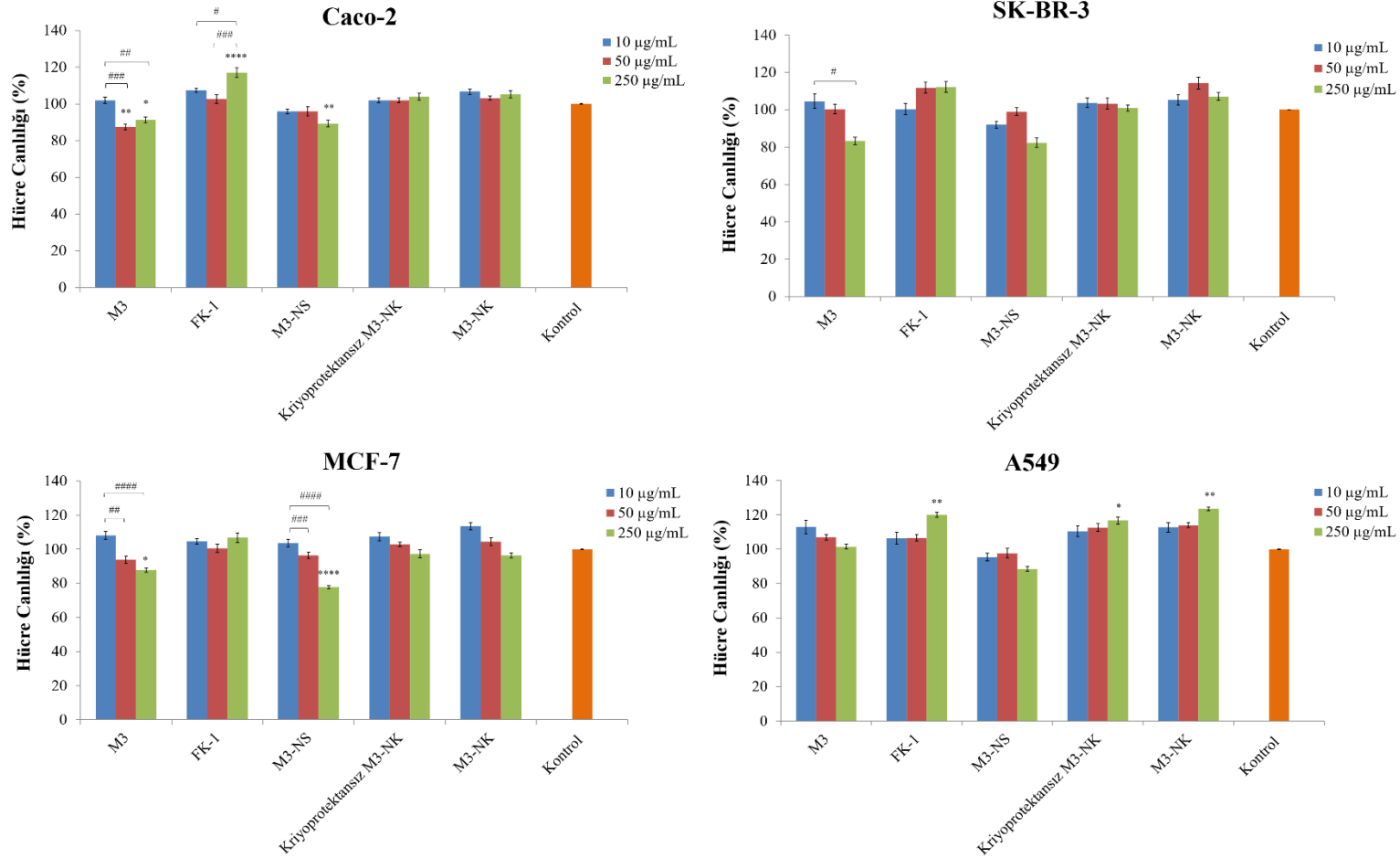
Şekil 4.60. DMSO kontrollerinin L929 hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksosite profilleri (Ortalama \pm SH; n=3) (**p<0,005, farklı yüzdelere karşılaştırıldığında).

4.10.5. M3 Nanokristal Formülasyonlarının Caco-2, MCF-7, SK-BR-3 ve A549 Hücrelerinin İn Vitro Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

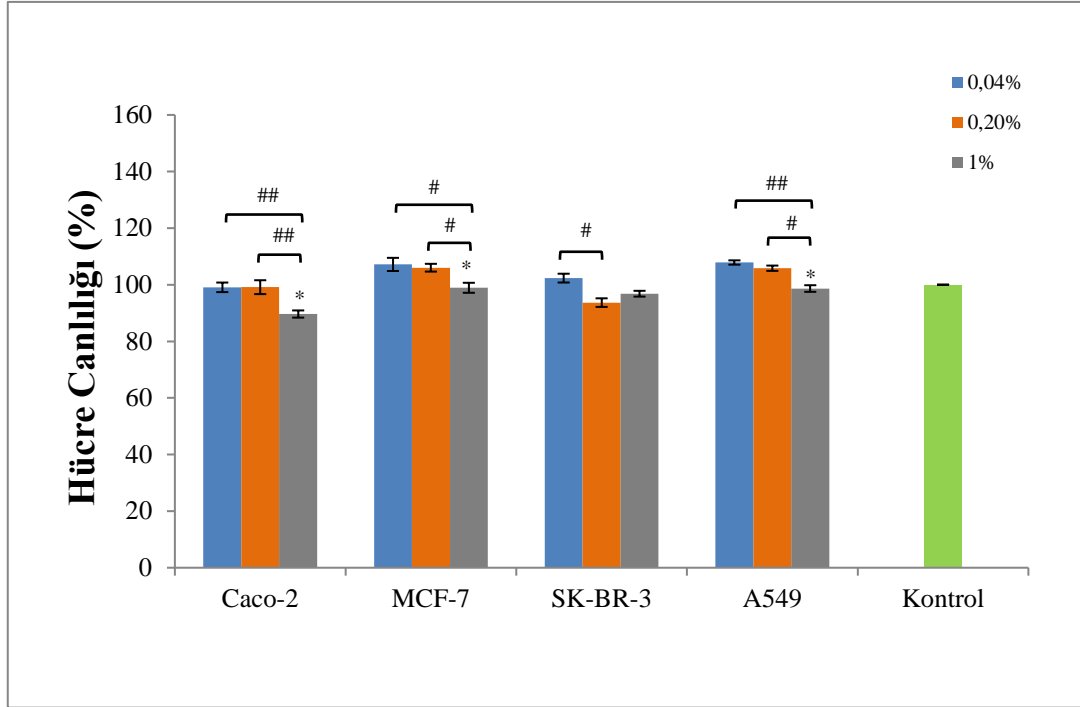
Farklı kanser hücre hatları üzerinde gerçekleştirilen sitotoksosite çalışma bulguları ve DMSO kontrollerine ait sitotoksosite bulguları Tablo 4.36.'de verilmiştir. M3, FK-1, M3-NS, kriyoprotektansız M3-NK ve M3-NK formülasyonlarının ve DMSO kontrollerinin Caco-2, MCF-7, SK-BR-3 ve A549 hücreleri üzerinde in vitro sitotoksosite profilleri ise Şekil 4.61. ve Şekil 4.62'de gösterilmiştir.

Tablo 4.36. Farklı kanser hücreleri üzerinde yapılan sitotoksikite çalışma bulguları (Ortalama \pm SH; n=3).

Örnek	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Caco-2	MCF-7	SK-BR-3	A549
	DMSO (%)				
M3	10	101,9 \pm 1,7	108,1 \pm 2,4	104,6 \pm 3,8	112,9 \pm 3,8
	50	87,5 \pm 1,6	93,8 \pm 2,1	100,3 \pm 2,5	106,9 \pm 1,5
	250	91,3 \pm 1,6	87,7 \pm 1,3	83,2 \pm 2,0	101,4 \pm 1,4
FK-1	10	107,4 \pm 1,2	104,6 \pm 1,7	100,4 \pm 3,1	106,4 \pm 3,5
	50	102,7 \pm 2,4	100,5 \pm 2,4	111,9 \pm 2,8	106,6 \pm 1,9
	250	117,0 \pm 2,6	106,8 \pm 2,9	112,2 \pm 2,8	120,0 \pm 1,5
M3-NS	10	95,9 \pm 1,4	103,5 \pm 2,2	91,9 \pm 1,8	95,4 \pm 2,2
	50	95,9 \pm 2,5	96,3 \pm 1,9	99,0 \pm 2,0	97,6 \pm 2,8
	250	89,4 \pm 2,0	77,7 \pm 0,9	82,3 \pm 2,6	88,6 \pm 1,4
Kriyoprotektansız M3-NK	10	101,9 \pm 1,2	107,5 \pm 2,4	103,7 \pm 2,7	110,5 \pm 3,1
	50	102,0 \pm 1,2	102,9 \pm 1,4	103,2 \pm 3,0	112,6 \pm 2,3
	250	103,9 \pm 1,8	97,4 \pm 2,4	100,8 \pm 1,6	116,7 \pm 2,0
M3-NK	10	106,7 \pm 1,5	113,5 \pm 2,1	105,3 \pm 2,9	107,7 \pm 2,8
	50	103,2 \pm 1,1	104,5 \pm 2,3	114,3 \pm 3,3	113,9 \pm 1,5
	250	105,1 \pm 1,9	96,4 \pm 1,5	107,1 \pm 2,1	123,5 \pm 1,1
DMSO Kontrol	0,04	99,1 \pm 1,7	107,2 \pm 2,3	102,3 \pm 1,6	107,9 \pm 0,8
	0,2	99,1 \pm 2,5	106,0 \pm 1,4	93,7 \pm 1,5	105,8 \pm 0,9
	1	89,7 \pm 1,3	98,9 \pm 1,8	96,8 \pm 1,0	98,7 \pm 1,2



Şekil 4.61. Farklı kanser hücreleri üzerinde yapılan in vitro sitotoksosite çalışma profilleri (Ortalama \pm SH; n=3) (*p<0,05, ** p<0,005, ****p<0,0001, kontrol ile karşılaştırıldığında; #p<0,05, ##p<0,005, ###p<0,001, ####p<0,0001, farklı konsantrasyonlarla karşılaştırıldığında).



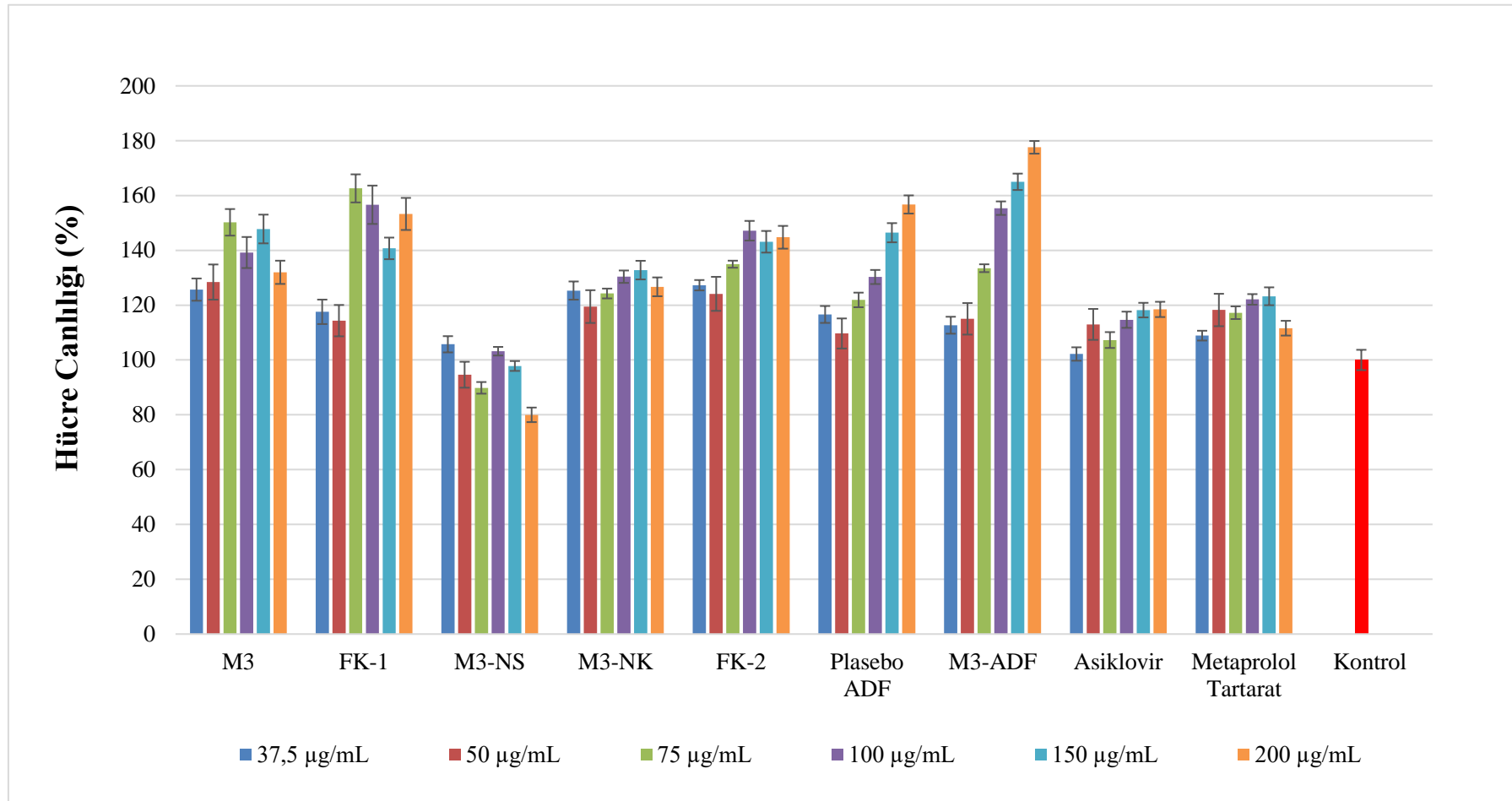
Şekil 4.62. DMSO kontrollerinin farklı kanser hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksosite profilleri (Ortalama \pm SH; n=3) (*p<0,05, kontrol ile karşılaştırıldığında; #p<0,05, ##p<0,005, farklı yüzdelere karşılaştırıldığında).

4.10.6. Nanokristal ve Ağızda Dağılan Film Formülasyonlarının İn Vitro Geçirgenlik (Permeabilite) Çalışma Sonuçları

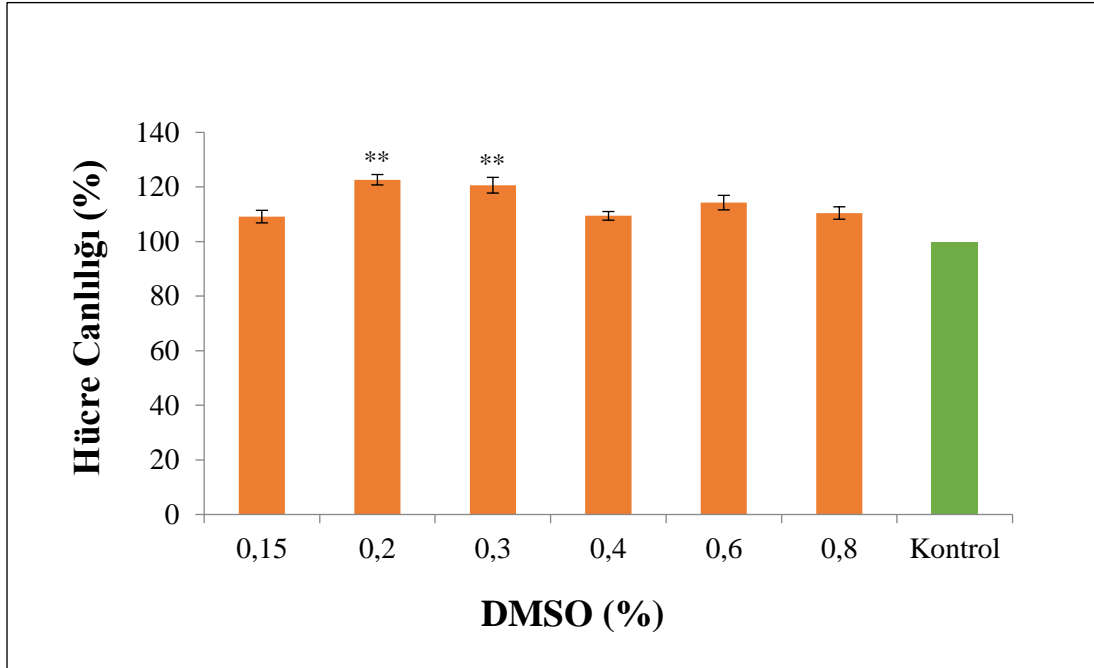
NKT ile çözünürlük özellikleri iyileştirilen M3 nanokristal ve ADF formülasyonlarının permeabilite çalışmalarında kullanılacak uygun ilaç dozunun belirlenebilmesi için yapılan sitotoksosite çalışma bulguları Tablo 4.37.'de verilmiştir. Örneklerin ve DMSO kontrollerinin Caco-2 hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksosite profilleri ise Şekil 4.63. ve Şekil 4.64.'de gösterilmiştir. İn vitro permeabilite çalışmaları sonuçları elde edilen bulgular Tablo 4.38.'de ve örneklere ait permeabilite katsayı (P_{app}) profilleri Şekil 4.65.'de özetlenmiştir. Sonuçlara göre M3, M3-NS, M3-NK ve M3-ADF formülasyonları için P_{app} değerleri sırasıyla $0,15 (\pm 0,01) \times 10^{-7}$ cm/sn, $1,24 (\pm 0,07) \times 10^{-7}$ cm/sn, $4,26 (\pm 0,50) \times 10^{-7}$ cm/sn ve $4,44 (\pm 0,10) \times 10^{-7}$ cm/sn olarak tespit edilmiştir.

Tablo 4.37. İn vitro Caco-2 permeabilite çalışmalarında kullanılacak uygun ilaç dozunun belirlenebilmesi için yapılan sitotoksosite çalışma bulguları (Ortalama \pm SH; n=3).

Örnek	Hücre Canlılığı (%)					
	Konsantrasyon ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					
	37,5	50	75	100	150	200
M3	125,7 \pm 4,1	128,4 \pm 4,8	150,2 \pm 5,7	139,2 \pm 4,0	147,8 \pm 5,2	131,9 \pm 4,2
FK-1	117,6 \pm 4,5	114,3 \pm 5,1	162,6 \pm 7,0	156,6 \pm 4,9	140,7 \pm 3,9	153,3 \pm 5,9
M3-NS	105,7 \pm 3,0	94,6 \pm 2,1	89,8 \pm 1,6	103,2 \pm 3,0	97,8 \pm 1,8	780,0 \pm 2,7
M3-NK	125,3 \pm 3,3	119,4 \pm 1,8	124,3 \pm 2,3	130,4 \pm 4,2	132,8 \pm 3,4	126,7 \pm 3,4
FK-2	127,3 \pm 3,1	124,1 \pm 2,7	134,9 \pm 2,6	147,2 \pm 3,3	143,1 \pm 3,5	144,8 \pm 3,3
Plasebo	116,6 \pm 3,1	109,7 \pm 1,4	121,9 \pm 2,5	130,3 \pm 1,6	146,4 \pm 3,0	156,7 \pm 2,3
ADF						
M3-ADF	112,7 \pm 2,4	115,0 \pm 3,0	133,5 \pm 3,0	155,4 \pm 2,0	165,0 \pm 2,7	177,6 \pm 2,8
Asiklovir	102,2 \pm 2,2	113,0 \pm 3,1	107,3 \pm 2,4	114,7 \pm 2,3	118,2 \pm 3,5	118,4 \pm 5,6
Metaprolol	108,9 \pm 1,6	118,2 \pm 1,4	117,2 \pm 2,7	122,1 \pm 3,1	123,2 \pm 2,0	111,6 \pm 2,4
Tartarat						
DMSO	109,1 \pm 2,3	122,7 \pm 1,9	120,7 \pm 2,9	109,4 \pm 1,6	114,3 \pm 2,7	110,5 \pm 2,3
Kontroleri						



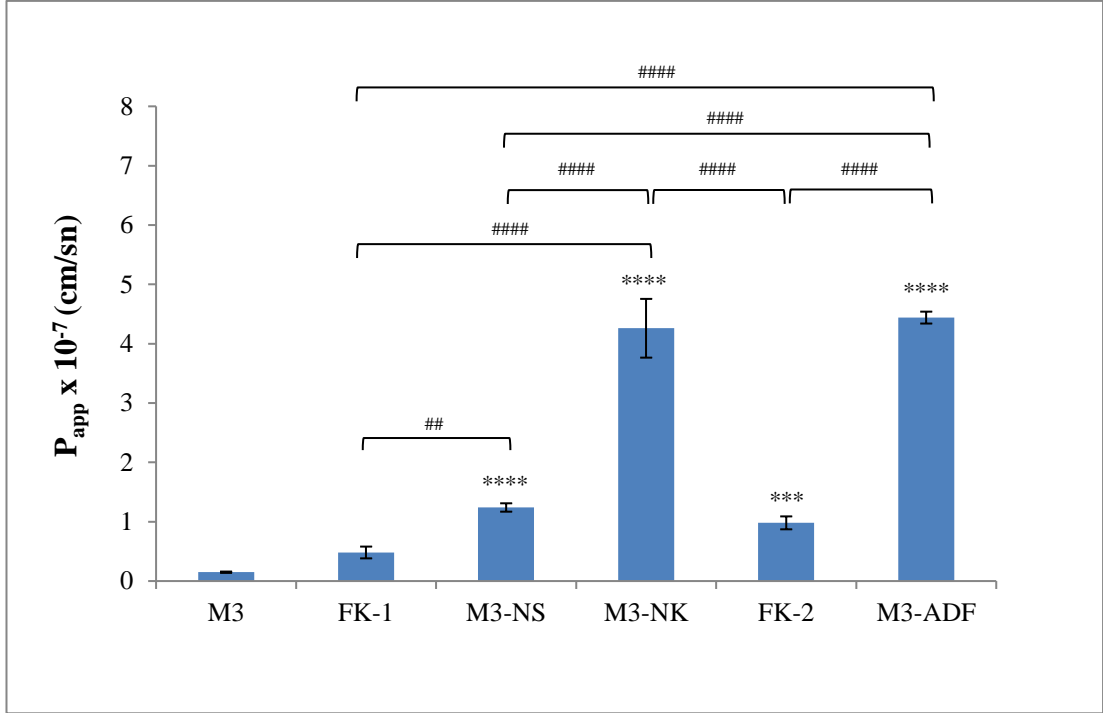
Şekil 4.63. İn vitro Caco-2 permeabilite çalışmalarında kullanılacak uygun ilaç dozunun belirlenebilmesi için yapılan in vitro sitotoksitesite çalışma profilleri (Ortalama \pm SH; n=3).



Şekil 4.64. DMSO kontrollerinin Caco-2 hücreleri üzerindeki in vitro sitotoksosite profilleri (Ortalama \pm SH; n=3) (**p<0,005, kontrol ile karşılaştırıldığında)

Tablo 4.38. İn vitro Caco-2 permeabilite çalışma bulguları (Ortalama \pm SS; n=3).

Örnek	Konsantrasyon ($\mu\text{g/mL}$)	Permeabilite Katsayısı ($P_{\text{app}} \times 10^{-7}$, cm/s)
M3	0,02 \pm 0,002	0,15 \pm 0,01
FK-1	0,08 \pm 0,016	0,48 \pm 0,10
MS-NS	0,20 \pm 0,012	1,24 \pm 0,07
M3-NK	0,69 \pm 0,081	4,26 \pm 0,50
FK-2	0,16 \pm 0,018	0,98 \pm 0,11
M3-ADF	0,72 \pm 0,016	4,44 \pm 0,10
Asiklovir	0,02 \pm 0,001	0,09 \pm 7,72
Metoprolol Tartarat	126,24 \pm 9,374	775,10 \pm 5,76



Şekil 4.65. İn vitro Caco-2 permeabilite çalışma sonuçlarına göre elde edilen geçirgenlik profilleri (Ortalama \pm SS; n=3) (**p<0,001, (****p<0,0001 M3 ile karşılaştırıldığında; #p<0,005, #####p<0,0001, farklı gruplarla karşılaştırıldığında).

5.TARTIŞMA

5.1. M3'ün Fizikokimyasal Özelliklerinin Değerlendirilmesi

Tez çalışmalarımız kapsamında kullanmış olduğumuz etkin madde yeni sentezlenmiş bir ilaç adayı moleküldür. Bu yüzden formülasyon çalışmalarımıza başlamadan önce M3'ün fizikokimyasal özellikleri çeşitli analizler ile incelenmiş ve sonuçlar literatürün bildirmiş olduğu aynı halka sistemini (DHP) içeren ticari etkin maddeler ile kıyaslanmıştır. M3'ün fizikokimyasal özelliklerini tayin etmek amacıyla UV ve FT-IR spektrumları çekilmiş, DSC, XRD, SEM analizleri, partikül büyüklüğü dağılım aralığı ve çözünürlük çalışmaları yapılmıştır. M3'ün 200-800 nm dalga boyu aralığında UV spektrumu incelendiğinde (Bkz.Şekil 4.1.); metanol:asetonitril:su (35:40:25, h/h/h) mobil faz sistemi içinde verdiği maksimum dalga boyu 241 nm olarak belirlenmiştir. Shaikh ve ark. (247) yapmış oldukları bir çalışmada nimodipinin maksimum absorbands verdiği dalga boyu tez kapsamında kullanılan aynı bileşimdeki mobil faz karışımı içinde 234 nm olarak saptanmıştır. Ayrıca literatürde farklı oranlarda olmak üzere aynı mobil faz bileşimi kullanılarak yapılan çalışmalarda nifedipin, nitrendipin ve felodipinin maksimum absorbands verdiği dalga boyları sırası ile 240 nm (17:35:48, h/h/h), 232 nm (30:40:30, h/h/h) ve 238 nm (50:15:35, h/h/h) olarak bildirilmiştir (248-250). Dijital bir refraktometre kullanılarak aseton içindeki üç farklı konsantrasyona sahip çözeltilisinden elde edilen analiz sonuçlarına göre M3'ün refraktif indeksi, literatürdeki ticari etkin maddelerin refraktif indeks değerlerine benzer olmak üzere 1,3582 olarak tespit edilmiştir (Bkz.Şekil 4.2.). M3 ile aynı halka sistemini içeren ticari etkin maddelerin refraktif indeks değerleri; nifedipin, nitrendipin, nimodipin, felodipin ve amlodipin için sırasıyla 1,54-1,33-1,41-1,33 ve 1,43 olarak bildirilmiştir (69, 251-254).

M3'ün partikül büyüklüğü, yüzey morfolojisi ve şeklini incelemek amacıyla 2500x, 5000x ve 7500x büyütme oranlarında olmak üzere farklı büyütme oranlarında SEM görüntülemeleri yapılmıştır (Bkz.Şekil 4.3.). Sonuçlar kristal yapıda partiküllerin varlığının yanı sıra kaba plaka şeklinde büyük partiküllerin de varlığını göstermiş olup 10 µm ve 100 µm aralığında saptanan partikül boyutu verileri "Malvern Mastersizer2000" cihazı ile elde edilen partikül boyutu ölçüm verileri ile uyumlu bulunmuştur. Ayrıca M3 partikül şekli, yüzey morfolojisi ve partikül boyutu

özellikleri ile literatürdeki ticari etkin maddelere de benzerlik göstermektedir. Huang ve ark. (177) yapmış oldukları bir çalışmada ham efonidipin kristallerinin SEM görüntülemeleri sonucu partikül boyutunu 20 µm ve 100 µm aralığında saptarken Zu ve ark.'nın (255) yapmış olduğu bir diğer çalışmada ham nimodipin kristallerinin 134,4 µm boyutunda olup kaba levhalar şeklinde partiküller olduğu saptanmıştır. M3'ün *Malvern Mastersizer2000* cihazı ile yapılan partikül büyüklüğü analiz sonuçlarına göre ortalama partikül boyutu d (0,1) için $14,392 \pm 0,583$ µm, d (0,5) için $102,006 \pm 7,518$ µm ve d (0,9) için $507,993 \pm 64,38$ µm olarak saptanmış olup literatürdeki ticari etkin maddelere hem görüntü hem de partikül boyutu olarak benzerlik göstermektedir. Hecq ve ark. (69) yapmış oldukları bir çalışmada *Malvern Mastersizer2000 cihazı* ile saf nifedipin kristallerinin partikül boyutunu ölçmüş ve ortalama partikül boyutunu d (0,1) için $21,9 \pm 0,2$ µm, d (0,5) için $98,7 \pm 0,4$ µm ve d (0,9) için $267,2 \pm 0,5$ µm olarak saptamışlardır. Xia ve ark. (71) tarafından yapılan bir çalışmada nitrendipin kristallerinin partikül boyutu 36,6 µm olarak ve Xiong ve ark. (256) tarafından yapılan başka bir çalışmada ise nimodipin kristallerinin partikül boyutu 30-100 µm olarak bildirilmiştir.

M3'ün DSC termogramları incelendiğinde (Bkz.Şekil 4.4.) 196,79°C'de endotermik bir pik gözlenmiş olup etkin maddenin erime derecesi 196,79°C olarak belirlenmiştir. DSC analiz sonuçları etkin madde için bildirilen erime derecesi aralığına (185-187°C) yakın olmakla birlikte literatürdeki ticari etkin maddelerin erime derecelerine de benzerlik göstermektedir. Huang ve ark. (177), Kassem ve ark., (174) ve Patel ve ark. (66) yapmış oldukları çalışmalarda DSC analizleri sonucu sırasıyla efonidipinin erime derecesini 171°C, lasidipinin erime derecesini 180,6°C ve nifedipinin erime derecesini 173,04°C olarak bildirmiştir. XRD difraktogramında amorf yapı varlığında herhangi bir pik gözlemlenmezken kristal yapı varlığında yapıya özgü tekrarlanabilir pikler bulunmaktadır. M3'ün XRD difraktogramı incelendiğinde özellikle 7° civarında gözlenen keskin pikin ve 5-20° aralığında gözlenen tekrarlı pik deseninin varlığı etkin maddenin kristal yapısını işaret etmektedir (Bkz.Şekil 4.5.). Ayrıca elde edilen XRD sonuçları, SEM görüntüleme sonuçlarını da doğrulamakta olup M3'ün kristal yapıda olduğu açık bir şekilde görülmektedir. XRD sonuçları literatür ile kıyaslandığında genel olarak nifedipin, nitrendipin, felodipin ve lasidipin gibi 1,4-DHP türevlerinin de XRD

difraktogramlarında 5-20° aralığında tekrarlı pik desenleri bildirilmiştir (66, 71, 174, 257). M3'ün FT-IR spektrumu incelendiğinde (Bkz.Şekil 4.6.) sırasıyla O-H ve N-H bağları nedeniyle 3300 cm⁻¹ ve 3200 cm⁻¹ civarında karakteristik gerilme bantlarına ek olarak, 1600-1500 cm⁻¹'de karbonil (C=O) ve çift bağ (C=C) gerilim bantları ve 1300- 1000 cm⁻¹ civarında ester grubunun güçlü C-O gerilim bantları görülmektedir. Ayrıca 1000 cm⁻¹ ve 800 cm⁻¹ civarındaki p-disübstitüe benzen gerilim bantları da M3'ün kimyasal yapısını doğrulamaktadır. FT-IR analizleri sonucu M3'e ilişkin elde edilen FT-IR spektrumunda karakteristik fonksiyonel gruplara ait piklerin ticari DHP türevlerinininkine benzer olduğu görülmektedir (66, 174).

5.2. M3 ve M3 Nanokristal Formülasyonu İçin Yapılan Çözünürlük Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi

M3'ün çözünürlük çalışmaları Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 2018 yılında yayınlanan protokolde belirtilen koşullar dikkate alınarak 3 farklı pH (pH 1,2 HCl, pH 4,5 Asetat, pH 6,8 Fosfat tamponları) ortamı ve su ortamında gerçekleştirilmiştir (94). Deneysel çalışmalardan önce aktif farmasötik bileşenden (API) çözünürlüğün ön tahmini için ilgili kılavuzda önerildiği üzere açık kaynaklı araçlardan "<http://www.swissadme.ch>" kullanılarak M3'ün tahmini çözünürlük değerleri teorik olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre M3'ün teorik çözünürlük değerleri; 2,32 µg/mL (ESOL), 0,118 µg/mL (Ali) ve 0,049 µg/mL (SILICOS-IT) olarak saptanmış olup bu değerlerden üst sınır olan 2,32 µg/mL değeri baz alınarak çözünebilecek etkin madde miktarının %30-40'ı kadar fazla madde miktarı ile çözünürlük çalışmaları yapılmıştır (Bkz. Şekil 4.7.). M3'ün gün ışığından etkilenmesi nedeni ile amber renkli cam vialler kullanılarak, 80 devir/dak. hızda ve 37 ± 1°C sıcaklıkta, yatay çalkalayıcılı su banyosunda, 2, 24, 48 ve 72 saat sürelerinde yapılan çözünürlük çalışmalarından elde edilen örnekler valide HPLC miktar tayin yöntemiyle analiz edilmiştir. İlgili kılavuzun önerdiği üzere M3'ün çözünürlük değerleri için çizilen çözünürlük (µg/mL)-zaman (saat) grafiğinde eğrinin sabitlendiği 24, 48 ve 72 saat verilerinin ortalamaları alınarak M3'ün farklı ortamlardaki çözünürlük değerleri hesaplanmıştır. Deneysel olarak M3'ün farklı ortamlardaki çözünürlük değerleri su, pH 1,2 HCl, pH 4,5 Asetat ve pH 6,8 Fosfat ortamları için sırasıyla 1,056 ± 0,166 µg/mL, 0,621 ± 0,042 µg/mL, 0,709 ± 0,087

$\mu\text{g/mL}$ ve $1,108 \pm 0,105 \mu\text{g/mL}$ olarak saptanmıştır (Bkz. Tablo 4.3.). M3'ün farklı ortamlardaki çözünürlük değerleri istatistiksel açıdan değerlendirilmiş olup Su-HCl, HCl-Fosfat ve Asetat-Fosfat ortamları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p < 0,05$). M3'ün deneysel olarak elde edilen doygunluk çözünürlüğünün ($1,056 \mu\text{g/mL}$) açık erişimli kaynaktan elde edilen teorik çözünürlük değerleri ($0,049 \mu\text{g/mL}$ - $2,32 \mu\text{g/mL}$) arasında yer aldığı tespit edilmiştir. Ayrıca literatürdeki ticari etkin maddelerin çözünürlük değerleri genel olarak $0,2$ - $18 \mu\text{g/mL}$ arasında değişmekte olup M3 için tespit edilen doygunluk çözünürlük değerinin ticari DHP'lerin çözünürlük değerleri ile de benzer nitelikte olduğu görülmektedir (245).

WHO 2018 kılavuzuna göre; etkin maddenin çözünürlüğünün düşük ya da yüksek olma durumu "DSV" hesabına göre yapılmaktadır. DSV $1,2$ - $6,8$ pH aralığındaki tüm ortamlar için 250 mL 'den az olduğunda bu etkin maddenin yüksek oranda çözünür olduğu kabul edilmektedir. Deneysel çalışmalar M3 için hesaplanan DSV değerlerinin her dört ortam için de (su ortamında; $87631,8 \pm 123,7 \text{ mL}$, pH $1,2$ HCl ortamında; $145600,7 \pm 100,6 \text{ mL}$, pH $4,5$ Asetat ortamında; $129132,3 \pm 131,4 \text{ mL}$, ve pH $6,8$ Fosfat ortamında; $81977,9 \pm 87,8 \text{ mL}$) 250 mL 'den büyük olduğunu göstermiştir (Bkz. Tablo 4.4.). Tüm bu sonuçlar etkin maddenin çözünürlüğünün düşük olduğunu kanıtlamakta olup BCS'de Sınıf 2 ya da 4'te yer alabileceğine işaret etmektedir.

Fiziksel karışım (FK-1) ve dondurularak kurutulmuş nanokristal formülasyonlarının (M3-NK) sudaki çözünürlüğü, kılavuzda belirtildiği gibi M3'ün çözünürlük çalışmaları ile aynı koşullar altında 24 saat boyunca gerçekleştirilmiştir. FK-1 ve M3-NK'nın sudaki çözünürlükleri sırasıyla $78,8 \mu\text{g/mL}$ ve $203,6 \mu\text{g/mL}$ olarak saptanmış olup NKT ile M3 ün çözünürlüğünde istatistiksel olarak anlamlı bir artış elde edilmiştir (FK-1 için yaklaşık 80 kat ve M3-NK için yaklaşık 200 kat artış) ($p < 0,05$) (Bkz. Tablo 4.7. ve Şekil 4.10.). Kassem ve ark. (174) yapmış oldukları bir çalışmada, çözücü-antiçözücü sonopresipitasyon tekniğine (çöktürme ve sonikasyon yöntemlerinin kombinasyonu olan kombine bir teknik) göre hazırladıkları lasidipin nanokristal formülasyonları ile ilacın sudaki çözünürlüğünde yaklaşık 100 kat artış olduğunu saptamıştır. Yapılan başka bir çalışmada, Jain ve ark. (63) çözücü-

antiçözücü tekniğine göre kandesartan sileksetil nanokristal formülasyonları hazırlamış ve ilacın sudaki çözünürlüğünde yaklaşık 15 kat artış olduğunu bildirmiştir. Tez kapsamında hazırlanan M3 nanokristalleri ile çözünürlük problemi olan ilacın çözünürlüğünde daha yüksek bir artış elde edildiği görülmektedir.

5.3. İn Vitro Çözünme Hızı Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Bir aktif farmasötik bileşenin biyolojik ortamdaki davranışının öngörülmesi için değerlendirilmesi gereken en önemli parametrelerden biri, bileşenin dozaj formundan çözünme hızıdır. Tez kapsamında yapılan in vitro çözünme hızı çalışmaları, çözünme ortamı ve analiz koşulları olarak FDA tarafından ticari DHP türevlerinden amlodipin besilat ağızda dağılan tablet (ADT) formülasyonları için önerilen koşullar temel alınarak gerçekleştirilmiştir (222) (Bkz. Tablo 3.1.). Bu amaçla 0,12 mg M3 ve 0,12 mg M3 içeren formülasyonlardan (Fiziksel karışım-1 (FK-1), optimum nanosüspansiyon formülasyonu (M3-NS), optimum nanokristal formülasyonu (M3-NK) ve ADF formülasyonu (M3-ADF)), 60 dak. boyunca belli aralıklarla örnekler alınmıştır. Alınan örnekler geliştirilen HPLC miktar tayini yöntemi ile analiz edilmiş ve in vitro çözünme değerleri tayin edilmiştir (Bkz. Tablo 4.8.). Deneysel çalışmalardan elde edilen % çözünen M3 değerleri zamana karşı grafiğe geçirilmiştir. M3'ün çözünme profili incelendiğinde 60 dak. sonunda çözünen ilaç miktarı %8,34 olarak tespit edilmiştir. Buna karşı fiziksel karışım ve tez kapsamında hazırlanan optimum formülasyonlar için genel olarak çözünen ilaç miktarının artmış olduğu gözlenmekle birlikte M3-NS, M3-NK ve M3-ADF formülasyonları için çözünen ilaç miktarının ilk 2,5 dak.'da %50'nin üzerinde olduğu saptanmıştır. İlaç çözünme profilindeki bu artış M3'ün hazırlanan formülasyon matrislerinde amorf yapıda olması ile birlikte artan doygunluk çözünürlüğü ile ilişkilendirilmiştir. XRD ve DSC analiz sonuçları da ilacın formülasyon matrisi içindeki amorfizasyonunu destekler niteliktedir.

Amerikan Farmakopesi'nde amlodipin besilat tabletleri için verilen test koşullarına göre, etikette belirtilen ilaç miktarının %75'inin 30 dak. içinde çözünmesi beklenmektedir (202). Tez kapsamında, modifiye çözünme koşulları altında, M3-NS, M3-NK ve M3-ADF formülasyonları için çözünen ilaç oranının sırasıyla 10. dak.'da (%77,1), 25. dak.'da (%75,93) ve 15. dak.'da (%78,88) %75'in üzerinde olduğu

tespit edilmiş olup, gerekli farmakope koşullarının sağlandığı görülmektedir. Çözünme hızı çalışması sonunda (60 dak.) çözünen ilaç miktarı M3, FK-1, M3-NS, M3-NK ve M3-ADF için sırasıyla; $8,34 \pm 0,1$, $50,62 \pm 0,7$, $87,10 \pm 1,7$, $82,71 \pm 1,3$ ve $94,27 \pm 0,4$ olarak saptanmıştır (Bkz. Tablo 4.8.). M3-NK için çözünen ilaç miktarının diğer formülasyonlara kıyasla düşük seyretmesinin nedeninin, sistem içindeki partiküllerin bir araya gelerek agregatlar oluşturması ve toz numunenin homojen bir şekilde alınamamasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. İn vitro çözünmenin 60 dak. sonunda tamamlanmamasının ise yine hazırlanan sistem içerisindeki partiküllerin agregasyonuna bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Kassem ve ark. (174) tarafından yapılan bir çalışmada, çözücü-antiçözücü sonopresipitasyon tekniğine (çöktürme ve sonikasyon yöntemlerinin kombinasyonu olan kombine bir teknik) göre lasidipin nanokristal formülasyonları hazırlanarak 0,1 M HCl ortamında 2 saat süreyle in vitro salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Yapılan in vitro salım çalışmalarından elde edilen bulgular değerlendirildiğinde ilk 30 dak.'da lasidipin nanokristallerinden çözünen ilaç miktarının %50 civarında olduğu saptanmıştır. Patel ve ark.'nın (66) yapmış olduğu başka bir çalışmada ise, yaş öğütme tekniği ile nifedipin nanosüspansiyon formülasyonları hazırlanmış ve optimum nanosüspansiyon formülasyonu üzerinde in vitro salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Seçilen optimum nanosüspansiyon formülasyonu için yapılan in vitro salım çalışmalarından elde edilen bulgular incelendiğinde ilk 15 dak. içinde ilacın %85'inin çözüldüğü tespit edilmiştir. Tez kapsamında hazırlanan M3-NK formülasyonu için elde edilen çözünme hızı profili bulguları Kassem ve ark.'nın (174) yapmış olduğu çalışma ile kıyaslandığında ilk 30 dak. içinde çözünen ilaç miktarının (%82,08) daha yüksek olmasına karşı M3-NS için elde edilen çözünme hızı profili bulguları Patel ve ark.'nın (66) yapmış olduğu çalışma ile kıyaslandığında ilk 15 dak. içinde çözünen ilaç miktarının (%69,29) daha düşük olduğu görülmektedir. M3-NK için çözünen ilaç miktarının nifedipin nanosüspansiyon formülasyonuna kıyasla düşük seyretmesi, temelde kullanılan etkin maddelerin doyunluk çözünürlüğündeki artışa bağlı olmakla birlikte sistem içindeki partikül agregasyonunun da in vitro çözünme hızı profilini etkilemesi ile açıklanabilir.

Pezik ve ark. (198) tarafından yapılan bir çalışmada, pullulan bazlı amlodipin besilat içeren ağızda dağılan film formülasyonları hazırlanmış ve seçilen optimum ağızda dağılan film formülasyonu için 0,01 N HCl çözünme ortamında 60 dak. boyunca in vitro salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ilk 20 dak.'da ilacın %78,1'i ve 60 dak. sonunda ise 86,2'si ağızda dağılan film formülasyonundan salınmıştır. Tez kapsamında üretilen pullulan bazlı M3-ADF formülasyonu için literatürdekine benzer in vitro çözünme hızı çalışma koşulları kullanılmış olup ilk 20 dak.'da ilacın %85,14'ünün ve 60 dak. sonunda ise 94,27'sinin çözüldüğü tespit edilmiştir. Literatür sonuçlarına kıyasla aynı süreler için elde edilen daha yüksek çözünme değerleri M3'ün düşük çözünürlüğünün NKT ile iyileştirilmesiyle ve M3 nanokristal formülasyonunda kullanılan poloksamer 188'in yüzey aktif madde özelliğinde bir stabilizan olup çözünme profili üzerindeki olumlu etkisiyle ilişkilendirilebilir (177).

5.4. M3'ün İn Vitro Miktar Tayin Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

DHP türevlerinin miktar tayin çalışmalarına ilişkin yapılan literatür taramaları, bu halka sistemini içeren etkin maddeler için birkaç farklı yöntemin kullanılabilir olduğunu ortaya koymuştur. Bu yöntemler UV spektrofotometresi (258), yüksek basınçlı (performanslı) sıvı kromatografisi (HPLC) (71, 223, 247, 248, 250) ters faz yüksek basınçlı (performanslı) sıvı kromatografisi (RP-HPLC) (249), yüksek basınçlı (performanslı) sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi (LC/MS/MS) (259) ve ultra performanslı sıvı kromatografisi-tandem kütle spektrometrisi (UPLC-MS/MS) (260) gibi tayin yöntemlerinden oluşmaktadır. Bu yöntemlerden LC/MS/MS ve UPLC-MS/MS'in daha çok in vivo miktar tayin çalışmalarında tercih edilmekle birlikte DHP türevlerinin nanofarmasötik dozaj formları ve katı dozaj formlarından in vitro miktar tayini için genellikle HPLC miktar tayin yönteminin kullanıldığı görülmektedir. Bu yüzden tez kapsamında yapılan çözünürlük, çözünme hızı, formülasyon verimlilik çalışmaları ve hücre kültürü çalışmalarında M3'ün miktar tayini için HPLC yöntemi tercih edilmiştir. Literatürde DHP türevi etkin maddelerin HPLC miktar tayini yöntemlerinde mobil faz sistemi olarak metanol:asetonitril:su, metanol:asetonitril:pH 3,0 trietilenamin

çözültüsü, metanol:su, metanol:pH 4,0 sodyum asetat, asetonitril:pH 4,8 potasyum dihidrojen fosfat monobazik (KH_2PO_4) gibi çözücü sistemlerinin kullanıldığı görülmektedir. Ayrıca çalışmaların hemen hemen hepsinde sabit faz olarak C_{18} kolon sistemi kullanılmıştır (66, 80, 83, 223-225). Tez kapsamında yapılan miktar tayin çalışmalarında sabit faz olarak C_{18} kolon sistemi seçilmiş ve farklı HPLC yöntem parametreleri ile denemeler yapılarak (farklı mobil faz bileşimi, akış hızı ve enjeksiyon hacmi) madde kromatogramının en uygun şekilde elde edildiği çözücü sistemi ile miktar tayini ve validasyon çalışmalarına devam edilmiştir. Yapılan denemelerden elde edilen sonuçlara göre M3'ün maksimum absorpsiyon verdiği dalga boyu olan 241 nm'de mobil faz sistemi olarak metanol:asetonitril:su (35:40:25, h/h/h) çözücü sistemi seçilmiştir. M3'ün sistemde alıkonma zamanı 7,967 dak. olarak saptanmış olup aynı türev etkin maddelerin aynı çözücü sistemi ve çözücü oranları ile analiz edildiği literatür çalışmaları ile oldukça yakın olduğu görülmüştür (Bkz. Şekil 4.13.). Shaikh ve ark. (247) yapmış oldukları bir çalışmada, nimodipinin miktar tayini için geliştirmiş oldukları HPLC miktar tayin yönteminde (mobil faz sistemi; metanol:asetonitril:su (35:40:25, h/h/h), sabit faz sistemi; ARP-C18 (250mm×4,6 mm, 5 μ) kolon, akış hızı; 0,8 mL/dak., enjeksiyon hacmi; 20 μ L) alıkonma zamanını 8,5 dak. olarak tespit etmiştir.

Analitik yöntem validasyon çalışmaları Uluslararası Uyum Konseyi (ICH) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından 2015 ve 2018'de yayınlanan protokollerde belirtilen koşullar dikkate alınarak yapılmış olup doğrusallık, duyarlılık, doğruluk, kesinlik (tekrarlanabilirlik, ara kesinlik, tekrar elde edilebilirlik), dayanıklılık ve özgüllük gibi ölçütler ile incelenmiş ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (226, 227). M3'ün 0,78-50 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyon aralığında elde edilen kalibrasyon doğrusunun ($y=35,883x+7,732$, $R^2=0,9999$) determinasyon katsayısının 1'e oldukça yakın saptanması, geliştirilen analitik yöntemin çalışılan konsantrasyon aralığı için pik alanları ve konsantrasyonlar arasında doğrusal bir ilişkinin olduğunu ve böylece yöntemin doğrusallık ölçütünü karşıladığını göstermiştir. Yöntemin doğruluğu ve farklı üç düzeyde (tekrarlanabilirlik, ara kesinlik, tekrar elde edilebilirlik) kesinliği değerlendirildiğinde, çalışılan üç farklı konsantrasyon (0,78-6,25-50 $\mu\text{g/mL}$) için hesaplanan %VK değerlerinin %2'den küçük olarak saptanması ile yöntemin doğruluk ve kesinlik ölçütlerini de karşıladığı

sonucuna varılmıştır. Geliştirilen yöntemin duyarlılığı saptanabilirlik sınırı (LOD) ve tayin edilebilirlik sınırının (LOQ) sırasıyla 0,178 µg/mL ve 0,568 µg/mL olarak hesaplanmasıyla gösterilmiştir. Dayanıklılık bulguları incelendiğinde; M3'ün 0,78 µg/mL, 6,25 µg/mL ve 50 µg/mL konsantrasyonlarındaki çözeltileri hazırlandıktan hemen sonra, 4 saat, 12 saat, 24 saat sonunda ve 24 saat boyunca +4 °C'de tutulduktan sonra analiz edilmiş ve HPLC analiz sonuçlarından elde edilen verilerden yola çıkılarak yapılan istatistiksel hesaplanmalarda %VK değerlerinin %2'den küçük olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlar da geliştirilen yöntemin dayanıklılığını kanıtlamasının yanı sıra M3'ün analiz süresi boyunca dayanıklı kaldığını göstermiştir. Yöntemin özgüllüğünü test etmek için geliştirilen HPLC yöntem koşullarında, çözücü ortamı ve formülasyon çalışmalarında kullanılan yardımcı maddeler (aseton, PEG 200, poloksamer 188, trehaloz, PG, pullulan, aspartam ve FDC yeşili) teker teker analiz edilmiştir. Çözünme ortamı ve kullanılan yardımcı maddelerin M3'ün pik verdiği zaman aralığında herhangi bir pik vermediği dolayısıyla herhangi bir girişimin söz konusu olmadığı gözlenmiş olup sonuçlar yöntemin özgüllük kriterini de karşıladığını göstermiştir.

5.5. Farklı Yöntem Koşulları ile PVA-M3 Nanokristallerinin Hazırlanmasına İlişkin Yapılan Önformülasyon Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Nanokristal formülasyonlarının hazırlanmasında seçilen etkin madde için en uygun yöntemin ve yöntem parametrelerinin belirlenmesi formülasyon çalışmalarının temelini oluşturmaktadır. Aşağıdan yukarıya tekniklerin istenilen partikül büyüklüğüne ulaşmakta yetersiz kalması, bunun yanı sıra öğütme ve yüksek basınçlı homojenizasyon gibi yukarıdan aşağıya tekniklerin her etkin maddeye uygulanamaması bu tekniklerin kombinasyonunu gerekli kılmıştır. Çöktürme teknolojileri arasında sıvı çözücü-antiçözücü eklenmesi tekniği daha basit bir yöntem olmasıyla en sık tercih edilen aşağıdan yukarıya tekniktir. Fakat bu teknolojiye kullanılan ilaç konsantrasyonu, seçilen stabilizan sistemi, ilaç/stabilizan oranı, çözücü ve antiçözücü hacmi, karıştırma hızı, sonikasyon süresi ve gücü ve çöktürme sıcaklığı gibi parametreler nihai ürünü önemli derecede etkilemektedir. Ayrıca çözücü/antiçözücü oranının, hazırlanan sistemde partikül boyutunu etkileyen en

önemli faktörlerden biri olduğu da bilinmektedir (63, 101). Tüm bu nedenlerden dolayı önformülasyon çalışmaları ile en iyi yöntem bileşenlerinin belirlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla tez kapsamında, hazırlanan M3 nanokristallerinin değişen yöntem parametrelerine verdiği yanıtın ve istenilen formülasyon çıktılarına yakınlığının değerlendirilmesi için bir dizi önformülasyon çalışması yapılmıştır. Yapılan formülasyon denemelerini literatür ile daha rahat ve doğru bir şekilde kıyaslamak için, ticari DHP'ler ve aynı teknik kullanılarak yapılan çalışmalarda stabilizan olarak PVA kullanıldığından PVA tercih edilmiştir. %0,1 PVA'nın kullanıldığı denemelerde F6 ve F7 haricindeki formülasyonlarda partikül büyüklüğü 1000 nm'nin altına indirilememiştir (Bkz. Tablo 4.15.). %0,1 PVA'nın kullanıldığı F1 formülasyonunun partikül büyüklüğü santrifüj öncesi ve sonrasında ölçülerek santrifüj işleminin gerekliliği incelenmiştir. Santrifüj öncesi $1238,3 \pm 2,4$ nm olan partikül büyüklüğü santrifüj sonrası $1102,3 \pm 3,6$ nm'ye inmiştir. Temelde formülasyon bileşimindeki organik solvan olan asetonun uzaklaştırılması için yapılan ultrasantrifüj işleminin PDI ve ZP değerlerini de iyileştirdiği görülmüştür. Farklı karıştırma hızlarını (800-400 rpm) kıyaslamak için yapılan F2 formülasyon çıktıları ($1086,1 \pm 0,5$ nm) karıştırma hızının partikül büyüklüğünü önemli ölçüde etkilemediğini gösterirken ($p > 0,05$), farklı karıştırma sürelerini (2,5-5 dak.) kıyaslamak için hazırlanan F3 formülasyon çıktıları ($1685,5 \pm 0,1$ nm) karıştırma süresinin artması ile partikül büyüklüğünün arttığını göstermiş olup bu sonuç çöktürme sonrası oluşan partiküllerin termodinamik açıdan kararsız olmaları ve karışma ile oluşan enerji karşısında kararlı hale geçmek için partikül agregasyonu eğiliminde olmaları ile açıklanabilir. Partikül agregasyonu ZP değerlerini önemli ölçüde etkilemezken, PDI değerlerinde artışa neden olarak monodispers bir sistemin oluşumunu zorlaştırmıştır. Çöktürme sıcaklığının etkisinin incelenmesi amacıyla 35°C 'de üretilen F4 formülasyonunda ($1778,6 \pm 5,7$ nm) sıcaklığın karıştırma süresine benzer bir etki ile partikül büyüklüğünde yaklaşık 2 kat artışa neden olduğu görülmüştür. Farklı sonikasyon güçlerini (200-100 W) kıyaslamak için hazırlanan F5 formülasyon çıktıları ($1904,9 \pm 2,3$ nm) ve farklı sonikasyon sürelerini (2,5-5 dak.) kıyaslamak için hazırlanan F6 formülasyon çıktıları ($811,2 \pm 4,4$ nm) partikül büyüklüğünün artan sonikasyon gücü ve süresi ile azaldığını göstermiş olup literatürde aynı hazırlama tekniği ve aynı stabilizan kullanılarak yapılan çalışma

sonuçları ile uyumlu bulunmuştur (71). Son olarak stabilizan yüzdesinin formülasyon çıktıklarına etkisini değerlendirmek amacıyla üretilen F8 formülasyonunda ($1823,3 \pm 8,5$ nm) partikül büyüklüğünün yaklaşık 2 kat arttığı saptanmıştır. Elde edilen tüm bu sonuçlar literatür bilgileri ile paralellik göstermekle birlikte M3 nanokristallerinin hazırlanmasında yöntem koşulları için karıştırma hızı; 800 rpm, karıştırma süresi; 2,5 dak., çöktürme sıcaklığı; 10°C 'nin altı, sonikasyon gücü; 200 W, sonikasyon süresi; 5 dak., ilaç konsantrasyonu; $1,25 \mu\text{g/mL}$ olarak seçilmiştir. Seçilen ilaç konsantrasyonuna uygun stabilizan yüzdesinin belirlenmesi için literatür daha geniş bir aralıkta ikiden fazla stabilizan yüzdesi denemesinin yapılmasını önermekte olup, daha sağlıklı bir sonuca ulaşabilmek için formülasyon çalışmalarının devamında stabilizan yüzdesi daha ayrıntılı değerlendirilmiştir.

5.6. Farklı Stabilizan Türü ve Oranları Kullanılarak M3 Nanokristal Formülasyonlarının Hazırlanması

M3 nanokristallerinin hazırlanmasında kullanılacak yöntem parametrelerine ilişkin yapılan önformülasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlar, partikül büyüklüğünde her ne kadar mikron boyutundan ($102,006 \pm 7,518 \mu\text{m}$) nanometre boyutuna ($811,2 \pm 4,4$ nm) düşülebildiğini gösterse de ZP değerlerinin ($-7,91 \pm 0,241$ mV) istenen değerlere (± 30 mV) yakın olmaması hazırlanan sistemlerin stabil sistemler olmadığını göstermektedir. Ayrıca daha stabil sistemlerin elde edilmesi amacıyla çeşitli kriyoprotektanlar kullanılarak yapılan kurutma işleminden sonra partikül büyüklüğü artabilmektedir. Partikül büyüklüğünün kurutma işleminden sonra tekrar mikron düzeyine çıkması, hedeflendiği gibi partikül büyüklüğü üzerinden çözünürlüğün ve biyoyararlanımın iyileştirilmesi stratejisini olumsuz etkileyebileceğinden daha ileri formülasyon çalışmalarında farklı stabilizan türü ve stabilizan oranları araştırılmıştır. Bu amaçla; PVA, PVP K30, SoluPlus® gibi polimerik stabilizanlar ve poloksamer 188, poloksamer 407, SDC ve SLS gibi yüzey aktif madde özelliğindeki stabilizanlar %0,05-0,1-0,5-1-2 (a/h) oranlarında kullanılmıştır.

Farklı stabilizan türü ve oranı ile hazırlanan nanosüspansiyon formülasyonları için ortalama partikül büyüklüğü, PDI ve ZP değerlerinin sonuçları incelenmiş olup (Bkz. Tablo 4.16.) genel olarak polimerik stabilizanlar (PVA, PVP K30, SoluPlus®),

SDC ve SLS ile hazırlanan nanosüspansiyonların partikül büyüklüğünün mikron boyutunda olduğu, poloksamer 188 ve poloksamer 407 ile hazırlanan nanosüspansiyonların partikül büyüklüğünün ise nano boyutta olduğu belirlenmiştir. Poloksamer 188 ve poloksamer 407 ile hazırlanan nanosüspansiyonlar için en uygun stabilizan oranının %0,1 ve %1 arasında olup %0,1'den daha düşük ya da %1'den daha yüksek oranlarda kullanıldığında partikül büyüklüğünde artış olduğu saptanmıştır. Bu durum düşük stabilizan oranı için kullanılan stabilizan miktarının sistemde var olan partiküllerin etrafında koruyucu bir sistem oluşturması için yetersiz olması nedeni ile agregasyonun oluşmasına ve yüksek stabilizan oranı için ise kristal büyümesine bağlanmıştır.

PDI değeri, partikül büyüklüğü dağılımını yorumlamak için kullanılan bir parametredir ve PDI değerinin 0,5'in altında olması dar partikül büyüklüğü dağılımı ile birlikte daha monodispers sistemlerin oluşumunu göstermektedir (261). PVP K30, poloksamer 188 ve poloksamer 407 ile hazırlanan tüm nanosüspansiyonlar için PDI değerlerinin, dar partikül büyüklüğü dağılımlarını teyit edecek şekilde 0,5'ten düşük olduğu belirlenmiştir.

ZP değerleri, nanosüspansiyonların fiziksel stabilitesini gösteren bir parametre olup sistemin uzun süreli stabilitesi stabilizanlar yardımı ile sağlanmaktadır. Optimum ZP değerlerinin ± 30 mV civarında olduğu ve daha yüksek bir ZP değerinin stabilitede artışa neden olabilmesine karşı toksisite ve gastrointestinal tahrişe de neden olabileceği bildirilmiştir (186, 261). Bu yüzden ilaç nanokristallerinin hazırlanmasında en kritik aşamalardan birisi stabilizan sisteminin türü ve oranının belirlenmesidir. Çünkü stabilizan miktarının yetersiz olması durumunda sistemde agregasyon sorunu yaşanırken, fazla olması durumunda ise kristal büyümesi (Ostwald Ripening Etkisi; Ostwald olgunlaşması) gibi sorunlar ile karşılaşmaktadır. En uygun stabilizan sistemi ve oranının seçimi genellikle deneysel çalışmalarla belirlenmektedir. Bu amaçla tez kapsamında farklı 7 stabilizanın (PVA, PVP K30, SoluPlus[®], poloksamer 188, poloksamer 407, SDC ve SLS) farklı 5 oranı (%0,05-0,1-0,5-1-2) ile çalışılmış ve SoluPlus[®] (düşük stabilizan konsantrasyonları için; %0,05-0,1-0,5), poloksamer 188 ve poloksamer 407 ile hazırlanan nanosüspansiyonların ZP değerlerinin önerilen aralıkta olduğu belirlenmiştir. Ancak, bu nanosüspansiyonlarda formülasyon parametreleri ile

stabilizan konsantrasyonları arasında doğrusal bir ilişki saptanamamıştır. SoluPlus® ile hazırlanan nanosüspansiyon formülasyonlarında ZP değerleri her ne kadar istenilen değerlere yakın olsa da, PDI değerlerinin çok yüksek olması ve partikül büyüklüğü değerlerinin poloksamerler ile üretilen nanosüspansiyon formülasyonlarına kıyasla daha yüksek olması en uygun stabilizan sistemi seçiminde elenmesine neden olmuştur. ZP değeri ± 60 mV ve üzerinde olan nanosüspansiyonlarda çok iyi bir stabiliteye karşı toksisite ve gastrointestinal tahriş gibi sorunların olabileceği, ± 30 mV olan nanosüspansiyonlarda iyi stabilite, ± 20 mV olanlarda kabul edilebilir stabilite, ± 5 mV altında olanlarda ise hızlı partikül agregasyonu sorunu olabileceği bildirilmiştir (178). SDC ve SLS ile hazırlanan nanosüspansiyon formülasyonlarında partikül büyüklüğünün yüksek olmasının yanı sıra ZP değerlerinin sistemde toksisite ve gastrointestinal tahriş problemlerine neden olabilecek kadar yüksek olması bu yüzey aktif madde özelliğindeki stabilizanların da en uygun stabilizan sistemi seçiminde elenmesine neden olmuştur. Poloksamer 407 ile elde edilen formülasyon çıktıları poloksamer 188 ile elde edilen formülasyon çıktılarına çok yakın olmakla birlikte daha düşük partikül büyüklüğü ve önerilen ZP değerlerine daha yakın ZP değerlerine sahip olması nedeni ile poloksamer 188 en uygun stabilizan olarak seçilmiştir. Sonuç olarak optimum nanosüspansiyon formülasyonu, %0,5 poloksamer 188 ile hazırlanan nanosüspansiyon (M3-NS) olarak belirlenmiş olup bu formülasyon için partikül büyüklüğü ve ZP değeri sırasıyla $431,4 \pm 1,2$ nm ve $-23,7 \pm 0,7$ mV olarak saptanmıştır.

5.7. Farklı Kriyoprotektan Türü ve Oranları Kullanılarak M3 Nanosüspansiyon Formülasyonlarının Kurutulması

Nanosüspansiyonlarda uzun süre fiziksel ve kimyasal stabilitenin korunması ve oral yolla kullanılacak ilaçların tablet, film ya da kapsül gibi katı ilaç formunda verilerek hasta uyuncunun artırılabilmesi amacıyla genellikle katı hal tercih edilmektedir (153). Tez kapsamında çözünürlük sorunu yaşayan M3'ün NKT ile nanosüspansiyonları hazırlanarak çözünürlüğünün artırılması stratejisinden sonra daha geniş bir hasta popülasyonunu da içine alarak hasta uyuncunun artırılması amacıyla ADF formülasyonlarının hazırlanması hedeflenmiştir. Bu yüzden hem katı hal stabilitesinin daha yüksek seyretmesi hem de ADF'in hazırlanması amacıyla seçilen

optimum nanosüspansiyon formülasyonu (%0,5 poloksamer 188'in kullanıldığı nanosüspansiyon; M3-NS) dondurarak kurutma (liyofilizasyon) tekniği ile kurutulmuştur.

Nanosüspansiyonların kurutulması işlemlerinde uygun yöntem koşullarının seçilmemesinin sistemde güçlü agregatların oluşması ve sistemin tekrar disperse edilememesi gibi sorunlar ile sonuçlanabileceği bildirilmiş ve bu sorunlar sistemin kurutulması sonrasında stabilizan sistemlerinin de katı hale geçmesi nedeniyle partiküllerin etrafındaki koruyucu etkilerinin azalmasına bağlanmıştır (178). Bu yüzden nanosüspansiyonun kurutulması sonuç ürünü etkileyen kritik işlemlerden biridir ve uygun yöntemin seçilmesi çok önemlidir. Dondurarak kurutma işleminde kurutma prosesi öncesinde formülasyona çeşitli kriyoprotektanlar (sükroz, laktoz, trehaloz, maltoz, dekstran ve mannitol gibi suda çözünen şekerler) ilave edilerek donmamış sıvı fazın oluşumu, donmuş ve donmamış fazın ayrışması ve sistemde agregatların meydana gelmesini engellemektedir. Ayrıca kriyoprotektanlar, nihai ürünün partikül büyüklüğünün istenilen boyutta tutulması ve hatta partikül büyüklüğünün küçültmesini de sağlamaktadır (153, 178). Fakat bu aşamada kullanılan kriyoprotektanın türü ve miktarı oldukça önemlidir. Bu amaçla en sık kullanılan kriyoprotektanın mannitol olduğu bildirilmiştir (181).

Tez kapsamında seçilen optimum formülasyonun dondurularak kurutulması aşamasından en uygun kriyoprotektan türü ve oranının belirlenebilmesi amacıyla farklı 5 kriyoprotektanın (mannitol, trehaloz, sükroz, dekstran ve dekstroz) farklı 3 oranı (%1,25-2,5-5) ile çalışılmış olup elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir (Bkz. Tablo 4.17.). Seçilen optimum nanosüspansiyon formülasyonunun kriyoprotektan kullanılmadan dondurularak kurutulmasından sonra genel olarak partikül büyüklüğü ve PDI değerlerinde bir artış ve ZP değerlerinde küçük bir düşüş ($547,8 \pm 10,3$ nm, $0,545 \pm 0,075$, $-20,1 \pm 0,5$ mV) olduğu saptanmıştır. Farklı kriyoprotektan türü ve oranları kullanılarak hazırlanan M3 nanokristallerinin formülasyon çıktıları incelendiğinde, kriyoprotektanların varlığında ZP değerlerinin korunduğu veya arttığı ve PDI değerlerinin özellikle düşük kriyoprotektan oranının kullanıldığı formülasyonlar haricinde istenilen sınır değer (0,5) altında seyrettiği gözlenmiştir. Partikül büyüklüğünün ise, düşük kriyoprotektan oranlarında (%1,25 ve %2,5)

artarken, yüksek kriyoprotektan oranlarında (%5) genel olarak azaldığı belirlenmiştir. Partikül büyüklüğünün azalması, kullanılan stabilizan ile kriyoprotektanın etkileşmesi sonucunda partikül yüzeyinde daha sıkı bir bağ ile yerleşmesine bağlanabilir. Sonuç olarak en düşük partikül büyüklüğü ($320,2 \pm 15,3$ nm) ve en iyi ZP değerinin ($-27,4 \pm 0,1$ mV) elde edildiği %5 trehaloz ile dondurularak kurutulmuş M3 nanokristal formülasyonu (M3-NK) optimum nanokristal formülasyonu olarak seçilmiştir. Xia ve ark.'nın (71) yapmış olduğu bir çalışmada nanoçöktürme ve ultrasonikasyon yöntemlerinin kombinasyonu ile PVA-nitrendipin nanokristalleri hazırlanmıştır. Seçilen optimum nanokristal formülasyonu için stabilizan yüzdesi; %0,15, çöktürme sıcaklığı; 3°C , sonikasyon gücü; 400 W, sonikasyon süresi; 15 dak., ilaç konsantrasyonu; 30 mg/mL olarak kullanılmış olup elde edilen nitrendipin nanosüspansiyonu herhangi bir kriyoprotektan kullanılmadan dondurularak kurutma tekniğine göre kurutulmuştur. Elde edilen nitrendipin nanokristallerinin partikül büyüklüğü ve ZP değeri sırasıyla 209 ± 9 nm ve $-13,9 \pm 1,9$ mV olarak belirlenmiştir. Tez kapsamında üretilen optimum M3 nanokristal formülasyonunun formülasyon çıktıları Xia ve ark.'nın (71) yapmış olduğu çalışma ile karşılaştırıldığında, (daha düşük bir sonikasyon gücü kullanılmasına rağmen) M3 nanokristallerinin partikül büyüklüğünün ($320,2 \pm 15,3$ nm) nitrendipin nanokristallerinin partikül büyüklüğüne yakın olduğu gözlenmektedir. Buna karşı M3 nanokristallerinin ZP değerinin ($-27 \pm 0,1$ mV), nitrendipin nanokristallerinin ZP değerinden daha iyi olması seçilen yöntem koşulları ile daha stabil bir sistemin hazırlandığını göstermektedir.

5.8. Ağızda Dağılan Film Formülasyonlarının Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Ağızda dağılan film formülasyonları suya ve çiğnemeye ihtiyaç olmadan kullanılabilmesi, yüksek hasta uyuncu, kolay ve kesin dozlama gibi avantajları sayesinde diğer katı dozaj şekillerine alternatif olabilecek potansiyele sahiptir. Bu nedenle çözünürlük problemi yaşayan M3'ün NKT ile çözünürlüğünün iyileştirilmesinden sonra ADF formülasyonlarının üretilmesi hedeflenmiştir. ADF formülasyonlarının hazırlanmasında daha esnek ve homojen, daha tekdüze bir

kalınlık ve iyi fiziksel özelliklere sahip ADF'lerin üretilmesine imkan sağlayan "çözücü dökme yöntemi" tercih edilmiştir.

ADF formülasyonlarının hazırlanmasında film yapıcı polimer olarak pullulan, nişasta/modifiye nişasta, sodyum aljinat, pektin, jelatin ve polimerize resin gibi doğal polimerlerin yanı sıra HPC, HPMC, NaCMC, PVA, Polietilen oksit (PEO), PVP gibi sentetik polimerler de kullanılabilir (210, 212, 214). Pullulan, yüzlerce patentli uygulaması olan eşsiz, doğal ve biyouyumlu bir polimerdir. Biyolojik olarak parçalanabilen pullulanın iyi film oluşturma özelliğine (esnek ve biyoadeziv özellikte filmlerin üretimi) sahip bir polimer olduğu bildirilmiştir (214-217, 219). Ayrıca pullulan suda kolayca çözüldüğü ve sulu çözeltilerinin pH'sının 5-7 arasında değişmekte olduğu bilinmektedir. Oral uygulama sonrası mukozanın tahriş olmaması ve hastalar için kabul edilebilir ADF'lerin üretilmesine olanak sağlayan nötre yakın bir pH profiline sahip olması açısından da diğer polimerlere kıyasla üstün bir film yapıcı ajandır (229). Literatürde film yapıcı ajan olarak pullulan ile yapılmış çok fazla çalışma bulunmamasına rağmen var olan çalışmalar oral yolla alınan ilaçların farmasötik dozaj formu haline getirilmesi konusunda oldukça başarılı sonuçların alındığını göstermektedir. Takeuchi ve ark. (262) tarafından yapılan bir çalışmada, pullulan ile hazırlanan filmlerin uygun film özelliklerini göstermesinin yanı sıra oldukça hızlı bir şekilde dağıldığı bildirilmiştir. Sharma ve ark. (233) tarafından yapılan başka bir çalışmada, pullulan:pektin (30:70, a/a) karışımı ile hazırlanan filmlerin uygun mekanik özelliklere sahip olduğu ve hazırlanan filmlerin 18 sn. gibi kısa bir sürede dağıldığı tespit edilmiştir. DHP türevleri ile yapılan bir diğer çalışmada ise, etkin maddenin permeabilitesinde anlamlı bir farklılık olmaksızın oldukça kısa sürede dağılan ve iyi film özelliklerine sahip ADF formülasyonlarının başarılı bir şekilde hazırlandığı bildirilmiştir (198). M3'ün sentez ürünü yeni bir molekül olması ve bir sentez döngüsü sonunda çok fazla miktarda üretilmemesi farklı tür polimerler kullanılarak yapılacak deneme sayısını sınırlandırmış olup DHP türevleri ile uyumlu ve iyi film özelliklerine sahip başarılı ADF'lerin hazırlanmasına olanak sağlaması nedeniyle M3-ADF formülasyonlarının hazırlanmasında film yapıcı ajan olarak pullulan tercih edilmiştir.

ADF formülasyonlarının esnekliğinin artırılması ve kırılabilirliğinin azaltılması gibi mekanik özelliklerinin iyileştirilmesinden sorumlu olan plastikleştiricilerin formülasyon bileşimi için uygun olmaması durumunda filmde çatlama, yarıma ve kenardan kopma gibi sorunlar görülmektedir. Plastikleştiricilerin hazırlanan ADF formülasyonunun kuruma prosesini etkilemesinin yanı sıra, filmin morfolojik özellikleri, yapışkanlığı ve etkin maddenin emilim hızında da etkin rol oynadığı bilinmektedir (198, 211, 212). Ayrıca plastikleştiricinin yoğunluğunun nihai filmin kalınlığını ve dolayısıyla dağılma süresini etkilediği ve yoğunluk ile film kalınlığı arasında doğru bir orantının olduğu bildirilmiştir (211). Kullanılan çözücü ve polimer ile geçimli bir plastikleştiricinin seçilmesi ADF formülasyonlarının hazırlanmasında en kritik aşamalardan birisidir. Bu nedenle pullulan ile en uyumlu plastikleştiricinin seçilmesi için yapılan önformülasyon çalışmalarında; gliserol, sorbitol ve propilen glikol ile denemeler yapılmıştır. Yapılan çalışmalarla genel olarak gliserol ile hazırlanan ADF'lerin (ADF-1) daha uzun sürede (20 saat) kurduğu, çok fazla yapışkan olup kalıptan çıkarken şekil deformasyonuna uğradığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar ile gliserol bazlı ADF'lerin (ADF-1), beklenen ve istenilen film özelliklerini tam olarak taşımadığı belirlenmiştir. Sorbitol ile hazırlanan ADF'lerin (ADF-2) homojen ve iyi yayılabilir özellikte olmalarına rağmen oldukça sert ve kırılabilir yapıda olmaları, kalıptan çıkarken kırılarak parçalanmaları istenilen film esnekliğine sahip olmadıklarını göstermektedir. Propilen glikol ile hazırlanan ADF'lerin (ADF-3) ise homojen, iyi yayılabilir özellikte, esnek ve uygun sertlikte olduğu bulunmuştur. Kalıptan çok rahat çıkmalarının yanında herhangi bir şekil deformasyonuna uğramamaları nedeni ile etkin maddeli ADF'lerin hazırlanması için plastikleştirici madde olarak propilen glikol seçilmiştir. Ayrıca elde edilen filmlerin kalınlığı incelendiğinde, gliserol (gliserol yoğunluğu; 1,26 g/cm³) ile hazırlanan ADF'lerin daha kalın olduğu tespit edilirken propilen glikol (propilen glikol yoğunluğu; 1,04 g/cm³) ile hazırlanan ADF'lerin daha ince olduğu tespit edilmiş olup elde edilen sonuçların literatür bilgileri ile uyumlu olduğu görülmektedir (211). Literatür bilgileri doğrultusunda propilen glikol'ün en uygun plastikleştirici olarak seçilmesi ile daha uygun mekanik ve morfolojik özelliklerin yanı sıra daha iyi dağılma ve çözünme profillerinin de elde edileceği düşünülmektedir.

Hazırlanan optimum ADF formülasyonları (M3-ADF) üzerinde kütle tekdüzeliği, kalınlık, yüzey pH'sı, nem tayini, içerik tekdüzeliği, dağılma testleri, mekanik kontroller gibi karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

M3-ADF formülasyonlarının kütle tekdüzeliği testi sonuçlarına göre (Bkz. Tablo 4.19.) ortalama kuru film ağırlığı $79,05 \pm 1,3$ mg olarak belirlenmiş ve genel olarak film ağırlıklarının 76,7-81,1 mg arasında olduğu tespit edilmiştir. Avrupa Farmakopesi'nde belirtilen koşullara göre (Bkz. Tablo 3.6.) hazırlanan M3-ADF'lerin kütle tekdüzeliği için alt sınır 71,15 mg ve üst sınır 86,96 mg olarak hesaplanmış olup hazırlanan ADF'lerin bireysel ağırlıklarındaki sapmaların, Avrupa Farmakopesi'nde belirtilen sınırlar içinde olduğu ve kütle tekdüzeliği için belirtilen koşulları sağladığı görülmektedir. İlgili literatür incelendiğinde hazırlanan ADF formülasyonlarının ağırlıklarının kullanılan hazırlama tekniği, formülasyon bileşimi ve ADF boyutuna göre farklılık göstermekte olup genel olarak 10-170 mg arasında değiştiği görülmektedir (198, 207-209, 211). Şahin ve ark. (207) tarafından yapılan bir çalışmada fosinopril sodyum içeren pullulan bazlı optimum ADF formülasyonlarının ağırlıklarının yaklaşık olarak 90 mg ve Pezik ve ark. (198) tarafından yapılan başka bir çalışmada amlodipin besilat içeren pullulan bazlı optimum ADF formülasyonlarının ağırlıklarının ise yaklaşık 135 mg olduğu bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlar pullulan ile hazırlanan ADF formülasyonları için hesaplanan değerlere yakın olup literatür ile uyumlu bulunmuştur (198, 207).

ADF formülasyonlarının kalınlığı, homojen ve tekdüze bir üretimin yanı sıra doz orantısallığı, filmin dağılması ve etkin maddenin çözünmesi açısından oldukça önemli bir parametredir. İdeal bir ADF, ince ve esnek olmasının yanında paketlemeye izin verecek ve hastaya ulaşana kadar bütünlüğünü koruyacak kadar dayanıklı değildir (205, 207). Çözücü dökme yönteminde genellikle çözücü uçurulduktan sonra filmin orta ve kenar kısımlarındaki kalınlıklarında yüksek sapmalar meydana gelebilmektedir. Bunun nedeni orta kısımlarda çözücünün daha hızlı ve rahat buharlaşması ve hazırlanan yaş ADF kütlelerinin kalıplara manuel olarak aktarılıp etüve yerleştirilmesi nedeni ile filmin kenar kısımlarının orta noktalara oranla daha kalın olmasıdır. Bu durum literatürde "*coffee ring effect*" olarak ifade edilmektedir (263). Bu yüzden ADF'lerin kalınlıklarının tespit edilmesinde tek bir

nokta ölçümü yerine farklı 5 nokta (orta ve 4 farklı kenar) ölçümü ile elde edilen sonuçların gerçeğe daha yakın değerler sunacağı düşünülmekte ve önerilmektedir. Tekrarlı kalınlık ölçümleri ile elde edilen maksimum %BSS değerlerinin %5'in altında olması gerektiği bildirilmiştir (209, 264). Hazırlanan M3-ADF formülasyonlarının kalınlık kontrolleri ilgili literatürün önerdiği şekilde (Bkz. Bölüm 3.2.7.) gerçekleştirilmiş olup elde edilen sonuçlara (Bkz. Tablo 4.20.) göre hazırlanan ADF formülasyonlarının kalınlığı $129 \pm 0,003 \mu\text{m}$ ve %BSS değeri %1,989 olarak saptanmıştır. Film oluşturucu polimer olarak pullulan kullanılan benzer çalışmalarda optimize edilmiş formülasyonlar için film kalınlıkları $70 \mu\text{m}$ (265), $100 \mu\text{m}$ (233) ve $116 \mu\text{m}$ (207) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca literatürde ortalama film kalınlığının 5-200 μm arasında olması gerektiği bildirilmiş olup elde edilen sonuçların literatür ile benzer ve uyumlu olduğu görülmektedir (209, 211, 229).

Tükürük pH'sının 5,8 ve 8,4 aralığında değişmekte olup ADF formülasyonlarının kullanım sonrası dağılması ve çözünmesi ile oluşan asidik ya da bazik pH'nın oral mukozayı yakından etkilediği bilinmektedir. İdeal bir ADF'in yüzey pH'sının oral mukozayı tahriş etmemesi ve dolayısıyla hastalar için kabul edilebilir olması için nötral pH'ya yakın olması istenmektedir (214, 265, 266). Hazırlanan M3-ADF formülasyonlarının ortalama yüzey pH'sı $6,29 \pm 0,10$ olarak saptanmıştır (Bkz. Tablo 4.21.). Film oluşturucu polimer olarak pullulan kullanılan benzer çalışmalarda optimum ADF formülasyonları için yüzey pH'sı 5,88 (198) ve 6,54 (207) olarak tespit edilmiştir. Elde edilen yüzey pH bulgularının literatüre benzer olmasının yanında nötral pH'ya yakın olması, hazırlanan ADF'lerin biyolojik ortam pH'sına uyumlu olduğunu göstermektedir.

ADF formülasyonları, suyun plastifiye edici etkisinden ötürü nem varlığında kuruma ve kırılmaya karşı korunmaktadır. Bu yüzden nem içeriği ADF'lerin mekanik özelliklerini ve stabilitesini doğrudan etkilemekte olan ve tespit edilmesi gereken en önemli kalite kontrol parametrelerinden biridir. Doğal bir polimer olan pullulanın nem içeriğinin (% loss on drying) %6 olduğu bildirilmiştir (229). Hazırlanan M3-ADF formülasyonlarının nem içeriği kontrolü Bölüm 3.2.7.'de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiş olup %6,58 olarak saptanmıştır. Elde edilen nem

içeriğinin in vivo kullanım için uygun olduğu görülmüştür. Gorle ve Patil (267), HPMC ile hazırlanan ve amlodipin besilat içeren ADF formülasyonlarının nem içeriğinin %4,88-7,38 aralığında olduğunu bildirmiştir. Film yapıcı polimer olarak pullulan kullanılan benzer çalışmalarda ise, ortalama nem içeriği %4,59 (207) ve %9,28 (198) olarak tespit edilmiştir.

ADF formülasyonlarının önformülasyon çalışmalarında karşılaşılan en önemli sorunlardan biri içerik tekdüzeliğinin sağlanamamasıdır. İçerik tekdüzeliği doz homojenliğinin en önemli göstergesi olmakla birlikte bu problemin üstesinden gelebilmek için literatürde tekli dozlara bölünmüş plastik kalıpların kullanılması ile oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir (198, 207). Bu nedenle M3-ADF formülasyonlarının üretilmesinde tekli dozlara bölünmüş plastik kaplar kullanılmış olup içerik tekdüzeliği çalışmaları Bölüm 3.2.7.'de belirtildiği gibi yapılmış ve farmakope gerekliliklerine uygunluk açısından değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hazırlanan M3-ADF formülasyonlarının içerik tekdüzelikleri %91,96-%102,84 arasında tespit edilmiş olup ortalama içerik tekdüzeliği ve %BSS değerleri sırasıyla $95,36 \pm 3,15$ ve %3,3 olarak saptanmıştır (Bkz. Tablo 4.22.). Ayrıca Amerikan Farmakopesi'nde belirtilen koşullara göre yapılan hesaplamalar sonucunda M3-ADF'ler için kabul değeri 10,7 olarak tespit edilmiştir (202). Hazırlanan her bir M3-ADF formülasyonundaki ilaç miktarı, Amerikan Farmakopesi'nde ticari bir DHP türevi olan amlodipin besilat için verilen limit değerler olan % 90-% 110 aralığında, %BSS değeri % 6'dan küçük ve kabul değeri 15'in altında olarak saptanmıştır. Sonuç olarak elde edilen bulgular ile hazırlanan M3-ADF formülasyonlarının farmakopeye uygunluğu gösterilmiştir.

İdeal bir ADF formülasyonunun üretiminden hasta tarafından alınıncaya kadar geçen süreçte bütünlüğünü koruyacak mekanik özelliklere sahip olması istenmektedir. Avrupa Farmakopesi'nde ideal bir ADF'in sahip olması gereken mekanik özellikler için "hasar görmeden ambalajlanmaya karşı uygun mekanik dayanıklılığa sahip olmak" gibi genel bir ifade kullanılmıştır (201). Hoffman ve ark. (205) uygun mekanik özelliklerin bir göstergesi olarak ADF'in yüksek bir % uzama, orta derecede bir gerilme direnci ve düşük bir elastik modülüs değerlerine sahip olması gerektiğini bildirmiştir. Ayrıca yüksek katlanma dayanıklılık değerinin ADF

formülasyonu için güçlü bir mekanik mukavemeti gösterdiği bilinmektedir (198, 204, 268). Elde edilen sonuçlara göre (Bkz. Tablo 4.23.) hazırlanan M3-ADF formülasyonlarının % uzama, elastik modülüs ve gerilme direnci değerleri sırasıyla $420,38 \pm 9,44$, $0,216 \pm 0,02$ MPa, $6,29 \pm 0,25$ MPa olarak saptanmıştır. Ayrıca rastgele seçilerek test edilen tüm M3-ADF formülasyonlarında katlanma direnci sayısı 200'den yüksek olarak belirlenmiştir. Akman ve ark. (211) tarafından yapılan bir çalışmada, didenozin içeren ADF formülasyonları üretilmiş ve yapılan mekanik kontroller sonucunda üretilen ADF'lerin %uzama, elastik modülüs ve gerilme direnci değerlerini sırasıyla; %9,79-49,29 arasında, 0,019-0,490 MPa arasında ve 0,219-7,940 MPa arasında tespit edilmiştir. Bülbül ve ark.'nın (208) yapmış olduğu başka bir çalışmada da, ketiapin fumarat içeren ADF formülasyonları üretilmiş ve üretilen ADF'ler üzerinde çeşitli mekanik kontroller yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar hazırlanan ADF'lerin % uzama değerlerinin %5,013-6,333 arasında, gerilme direnci değerlerinin 2,120-3,650 N/cm² arasında ve katlanma direnci değerlerinin ise 5,0-11,83 arasında olduğunu göstermiştir. Film yapıcı polimer olarak pullulan kullanılan benzer çalışmalarda ise, sırasıyla % uzama, elastik modülüs ve gerilme direnci değerleri %89,62, 9,45 MPa, 4,5 MPa (207) ve %124, 97,84 MPa, 6,65 MPa (198) olarak tespit edilmiştir. M3-ADF formülasyonlarının mekanik özellikleri literatürdeki pullulan bazlı çalışma sonuçları ile kıyaslandığında çok daha yüksek %uzama, yakın gerilme direnci ve daha düşük elastik modülüs değerlerinin elde edilerek daha iyi mekanik özelliklere sahip ADF'lerin üretildiği sonucuna varılabilir. Katlanma direnci sonuçları ise literatürdeki sonuçlara benzer bulunmuştur (198, 207).

Bir ADF formülasyonunun mekanik olarak dirençli olmasının yanı sıra ağızda hızlı bir şekilde dağılması ve içerdiği etkin maddeyi hızlı bir şekilde salıvermesi istenmektedir (205, 207). ADF formülasyonunun hazırlanmasında kullanılan polimerin fizikokimyasal özelliklerinin ADF'lerin dağılma süresinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir (198, 269). Kulkarni ve ark. (270) pullulan ve HPMC E15 olmak üzere farklı polimerler kullanarak yapmış oldukları bir çalışmada pullulan ile elde edilen ADF'lerin istenen film özelliklerini taşımasının yanı sıra en kısa dağılma süresine sahip olduğunu tespit etmiş ve pullulanı diğer polimer ile kıyaslayarak “*en iyi film oluşturucu polimer*” olarak tanımlamıştır. Bu nedenle film yapıcı polimer

olarak pullulan kullanılarak hazırlanan M3-ADF formülasyonlarının dağılma sürelerinin literatür bilgileri ışığında kısa olması beklenmektedir. M3-ADF formülasyonlarının dağılma süresi testleri, literatürde önerildiği gibi “*Petri Kabı Yöntemi*” ve “*Damla Yöntemi*” olmak üzere iki farklı yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Biyolojik ortamın tam olarak taklit edilebilmesi ve aradaki farkın tespit edilebilmesi amacıyla dağılma testleri distile su ortamının haricinde pH 5,7 yapay tükürük ortamı için de aynı koşullarda gerçekleştirilmiş ve sonuçlar kıyaslanmıştır. Yapılan çalışmalarda petri kabı yöntemi için petri kabı çalışma boyunca çalkalanmadan sabit tutularak ADF’lerin tamamen parçalandığı/dağıldığı ve damla yöntemi için ADF’de bir deliğin oluştuğu zamana kadarki süreler dikkate alınmıştır. M3-ADF formülasyonlarının dağılma testi bulgularına (Bkz. Tablo 4.24 ve Tablo 4.25.) göre; genel olarak yapay tükürük ortamında yapılan çalışma verilerinin distile su ortamında yapılan çalışma verilerinden daha yüksek olduğu tespit edilmekle birlikte veriler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanamamıştır ($p>0,05$). Distile su ortamında ADF’lerin dağılma süresi petri kabı yöntemine göre $21,3 \pm 2,3$ sn ve damla yöntemine göre $12,7 \pm 0,9$ sn olarak belirlenmiştir. pH 5,7 yapay tükürük ortamında ise ADF’lerin dağılma süresi petri kabı yöntemine göre $23,0 \pm 1,2$ sn ve damla yöntemine göre $14,5 \pm 0,5$ sn olarak hesaplanmıştır. Avrupa Farmakopesi’ne göre; ağızda dağılan tabletler ve liyolize tozlar için dağılma süresi 3 dak.’dan az olmalıdır (201). Kullanılan dağılma testi cihazı her ne kadar ağız boşluğundaki fizyolojik koşulları tam olarak taklit etmese de dağılma süresi için belirtilen sınır değerlerin genellikle ADF’ler için kullanılabildiği belirtilmiştir (205). Buna göre M3-ADF formülasyonları için belirlenen dağılma süresi değerlerinin Avrupa Farmakopesi’nde belirtilen sınır değerinin altında olduğu görülmektedir.

ADF formülasyonlarının dağılma ve çözünme profillerinin öngörülmesinde dağılma testleri fikir vermesi açısından büyük bir öneme sahip olsa da bu dozaj formları için dağılma ve çözünme prosedürlerinin güçlkle ayırt edilebildiği bildirilmiştir (207, 209). Şahin ve ark.’nın (207) yapmış olduğu bir çalışmada fosinopril sodyum içeren ADF’lerin dağılma testleri standart olması açısından farmakopelerde konvansiyonel tablet ve kapsüller için verilen testler temel alınarak gerçekleştirilmiştir. Ancak dağılma testleri sırasında ıslanmanın gerçekleştiği an

ADF'lerin şeffaf hale gelmesi nedeniyle dağılma sürelerinin tam olarak ayırt edilemediği ve bu testin ortam hacmi açısından da ağız boşluğunun doğal koşullarını tam olarak yansıtmadığı sonucuna varılmıştır. Sonuç olarak ADF'lerin dağılma testleri literatürde verilen iki farklı yöntem (petri kabı yöntemi ve damla yöntemi) kullanılarak gerçekleştirilmiş olup fosinopril sodyum içeren pullulan bazlı ADF'lerin dağılma süreleri damla yöntemine göre; 27 sn ve petri kabı yöntemine göre 75 sn olarak tespit edilmiştir. Film yapıcı polimer olarak pullulanın kullanıldığı başka bir çalışmada ise, amlodipin besilat içeren ADF'lerin dağılma süreleri damla yöntemine göre; 28,8 sn ve petri kabı yöntemine göre 51,3 sn olarak saptanmıştır (198). Shelke ve ark. (271) yapmış oldukları bir başka çalışmada da, film yapıcı polimer olarak sodyum aljinatın kullanıldığı amlodipin besilat içeren ADF formülasyonlarının 142 sn'de dağıldığını bildirmiştir. Tez kapsamında üretilen M3-ADF formülasyonlarının literatürde belirtilen çalışmalara kıyasla daha kısa sürede dağılması, NKT ile M3'ün doygunluk çözünürlüğünün artırılmasının ilacın dağılma ve çözünme profilini de iyileştirmesine bağlı olabileceği düşünülmektedir.

5.9. Caco-2 Permeabilite Çalışmalarında Kullanılan Nanokristal ve Ağızda Dağılan Film Formülasyonlarının Fizikokimyasal Özelliklerinin Değerlendirilmesi

5.9.1. Taramalı Elektron Mikroskop Analizi

Nanokristal formülasyonlarının yüzey özelliklerinin, partikül şeklinin ve partikül boyutu dağılımının belirlenmesi için genellikle SEM ve transmisyon elektron mikroskop (TEM) gibi görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır (168, 272, 273). Nanokristal formülasyonlarının kurutulması sonucu sistemde meydana gelebilecek agregasyon ile partikül boyutu büyümesi SEM ile görüntülenebilmektedir (168, 273). Ayrıca ADF formülasyonlarının yüzey özelliklerinin yanı sıra enine kesit görüntüleri de SEM ile tespit edilebilmektedir (198). Bu yüzden M3, poloksamer 188, fiziksel karışımlar (FK-1 ve FK-2), M3-NK ve M3-ADF'ye ait morfolojik analizler farklı büyütme oranlarında (100x, 200x, 250x, 1000x, 2000x, 2500x, 3000x, 5000x, 6000x, 7500x, 10,000x, 20,000x ve 50,000x) SEM ile yapılmıştır.

M3'e ait farklı büyütme oranlarındaki (2500x, 5000x ve 7500x) SEM görüntülerinde uzun ince çubuk şeklinde kristal yapıdaki partiküllerin varlığının yanı sıra kaba plaka şeklinde büyük partiküllerin de varlığı görülmektedir (Bkz.Şekil 4.3.). 10 µm ve 100 µm aralığında saptanan partikül boyutu verileri, “*Malvern Mastersizer2000*” cihazı ile elde edilen partikül boyutu ölçüm verileriyle benzerlik göstermektedir. Nanokristal formülasyonlarında kullanılan poloksamer 188'in SEM görüntülerinde ise, literatür ile uyumlu olmakla birlikte tamamen küresel ve büyük polimerik yapısına kanıt olacak şekilde 40-1000 µm aralığında partikül boyutuna sahip partiküllerin olduğu görülmektedir (Bkz.Şekil 4.22.) (274). M3 ve poloksamer 188'i içeren FK-1 için elde edilen SEM görüntülerinde (Bkz.Şekil 4.23.) poloksamer 188'in sahip olduğu küresel partiküllerin yanı sıra poloksamer 188'in poröz açıklıkları içinde M3'ün partikül şekline benzer partikül görüntüleri dikkat çekmiştir. Bu görüntüler etkin maddenin stabilizan madde olarak kullanılan poloksamer 188 partiküllerinin poröz boşluklarında konumlanarak kaplanma eğilimini açıkça göstermektedir.

Çöktürme ve ultasonikasyon yöntemlerinin kombinasyonu ile hazırlanan M3-NK formülasyonlarının (Bkz.Şekil 4.25.) farklı büyütme oranlarında (200x, 1000x, 2000x, 2500x, 5000x, 60000x ve 10,000x) incelenen SEM görüntülerinde 1000 nm'nin altında yuvarlak-yassı tekdüze partiküller görülmektedir. Literatürde nanosüspansiyon hazırlama yöntemlerinde uygulanan işlemler (sıcaklık, basınç, çarpma ve itme kuvvetleri) ve liyofilizasyon işlemi sonrasında etkin madde partiküllerinin küresel hale gelebileceği bildirilmiştir (168, 178). Uzun ince çubuk görümlü kristal yapıdaki M3 partiküllerinin M3-NK formülasyonları içinde daha tekdüze ve yuvarlak halde olması formülasyon hazırlama işlemleri sonrasında partiküllerin kristal halden amorf hale geçişi ile ilişkilendirilmiştir. Bu katı hal karakteristiğinin değişimini, DSC analiz termogramında etkin madde erime pikinin ve XRD analiz difraktogramında herhangi bir pikin gözlenmemesi bulguları da desteklemektedir.

M3-NK, aspartam ve pullulanı içeren FK-2'nin (Bkz.Şekil 4.24.) SEM görüntülerinde yuvarlak-yassı M3-NK partikülleri ve ince uzun ipliksi pullulan partikülleri oldukça net görülmektedir. Pullulanın SEM görüntülerindeki ince ağsı

yapısı literatür ile uyumlu bulunmuştur (275, 276). M3-ADF formülasyonlarının yüzey görüntüleri (Bkz.Şekil 4.26.) incelendiğinde herhangi bir çizik, kristal veya aglomerasyon olmaksızın oldukça homojen ve pürüzsüz bir görüntünün yanı sıra film yapıcı polimer olarak kullanılan pullulan molekülleri arasındaki çapraz bağlar da açıkça görülmektedir. Bu çapraz bağlar ADF formülasyonlarında yüksek mekanik mukavemetten ve filmin dayanıklılığından sorumlu olmakla birlikte elde edilen sonuçlar hazırlanan M3-ADF formülasyonlarının iyi mekanik özelliklerini de desteklemiştir. Film yüzeyinde herhangi bir kristal yapının görülmemesi, literatürde ADF formülasyonu içindeki etkin maddenin amorf halde olabileceğine atfedilmiştir (198). Literatür bilgileri ışığında M3-ADF formülasyonları için kristal partikül görüntülerine rastlanmaması, M3-NK içindeki etkin maddenin amorf durumda olduğu sonucunu desteklemiştir. M3-ADF formülasyonlarının sıvı azot kullanılarak özel bir teknikle numune hazırlama işleminden sonra yapılan SEM analizleri sonucu elde edilen kesitsel görüntülerinde (Bkz. Şekil 4.27.) filmlerin ağızda hızlı dağılmasını destekler nitelikte homojen, yüksek gözenekliliğe ve yüzey alanına sahip olduğu görülmektedir. Kabaş ve ark. (168) yapmış oldukları bir çalışmada; ultra turaks, bilyeli değirmen ve yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemlerinin kombinasyonu ile rivaroksaban nanokristallerini hazırlamış ve elde edilen SEM görüntüleri ile kristal yapıdaki etkin madde partiküllerinin nanokristal formülasyonlarında düzensiz küresel şekilli partiküller şeklinde görüntülediğini bildirmiştir. Taşhan ve ark.'nın (277) yapmış olduğu bir diğer çalışmada ise, yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi ile ziprasidon nanosüspansiyonları hazırlanmış ve elde edilen SEM görüntülerinde etkin maddeye ait kristal yapının nanosüspansiyonlarda küresel bir yapıya dönüştüğü ve daha homojen bir partikül dağılımı görüldüğü tespit edilmiştir (278).

5.9.2. Diferansiyel Taramalı Kalorimetri Analizi

Formülasyon çalışmaları sırasında oluşabilecek etkileşimler ve polimorfik değişimler, DSC analizleri ile gözlenebilmektedir (178). DSC analizleri erime endotermelerindeki ve ekzotermelerdeki kaymaları ve karşılık gelen reaksiyon entalpilerindeki varyasyonları tespit ederek formülasyondaki ilacın fizikokimyasal durumu hakkında bilgi vermektedir (198). M3'ün kristal yapısı ve termal

özelliklerindeki değişimin incelenmesi amacıyla bazı yardımcı maddeler (poloksamer 188 ve pullulan), hazırlanan formülasyonlar (M3-NK ve M3-ADF) ve bu formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddeleri içeren fiziksel karışımlar (FK-1 ve FK-2) için DSC analizleri yapılmıştır.

Literatürde bildirildiği gibi kristal yapıdaki maddeler DSC termogramlarında karakteristik keskin ve genellikle şiddetli bir erime piki verirken amorf yapıdaki maddeler herhangi bir pik vermemekte veya geniş ve yayvan pike benzer bir görüntü vermektedir (168, 178, 279, 280). M3'ün DSC termogramında (Bkz.Şekil 4.4. ve Şekil 4.34.) 196,79°C'de endotermik bir pik gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar M3'ün DSC termogramında verdiği pikin ticari DHP'lerinkine benzer olmasının yanında etkin maddenin kristal yapısını doğrulamıştır (66, 174, 177).

Poloksamer 188'in DSC termogramı (Bkz. Şekil 4.28 ve Şekil 4.34.) incelendiğinde 55,59°C'de keskin bir pik verdiği görülmekte olup sonuçlar literatür ile uyumlu bulunmuştur (178, 281). M3 ve poloksamer 188'i içeren FK-1'in DSC termogramı incelendiğinde (Bkz. Şekil 4.29 ve Şekil 4.34.) ise, 55,77°C'de keskin fakat poloksamer 188'inkine kıyasla daha düşük şiddette endotermik bir pik verdiği ve M3'ün erime pikinin kaybolduğu görülmüştür. Etkin madde pikinin kaybolmasının FK-1 bileşimindeki M3 miktarının düşük olması ve poloksamer 188'in etkin maddeyi kaplamasına bağlı olarak gerçekleştiği düşünülmektedir. FK-1'in SEM görüntülerinde poloksamer 188'in sahip olduğu poröz yapılar içindeki etkin madde partiküllerinin varlığı da bu sonucu destekler niteliktedir.

Fu ve ark. (175) yapmış oldukları bir çalışmada, mikroçöktürme ve yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemleri ile nimodipin nanokristal formülasyonları hazırlamıştır. DSC analizleri sonucu elde edilen termogramlardaki etkin madde pikinin fiziksel karışım ve nanokristal formülasyonlarının termogramlarında kaybolmasını formülasyonlara yüklenen ilaç miktarının çok düşük olması ve DSC'nin bu ilaç kristallerini belirleyebilecek kadar hassas olmamasına ve kristal yapıdaki ilacın poloksamer F127 içinde çözünmüş olabileceğine dayandırmıştır.

Çöktürme ve ultrasonikasyon yöntemlerinin kombinasyonu ile hazırlanan nanokristal formülasyonlarının DSC termogramları incelendiğinde (Bkz.Şekil 4.30.

Şekil 4.34 ve Şekil 4.35.) M3'ün DSC termogramında gözlenen keskin ve şiddetli erime pikinin kaybolduğu, 47,97°C ve 280,64°C'de düşük şiddette iki erime pikinin var olduğu gözlenmiştir. 47,97°C'de gözlenen düşük şiddetli endotermik pikin biraz kaymakla birlikte formülasyon içinde etkin madde ile etkileşmeyen serbest poloksamer 188 moleküllerine ve 280,64°C'de gözlenen endotermik pikin ise biraz kaymakla birlikte nanosüspansiyonların liyofilizasyonunda kullanılan trehaloz moleküllerine ait olabileceği düşünülmektedir. Jackson ve ark. (282) yapmış oldukları bir çalışmada pik kaymasının nedenini Gibbs-Thomson eşitliğine göre hidrodinamik yarıçaptaki azalmanın Gibbs serbest enerjisini arttırmasına bağlamıştır. Bazı ilaçların nanokristal hazırlama işlemleri (yüksek basınçlı homojenizasyon, ultrasonikasyon ve öğütme) sırasında kristal yapılarını korurken bazı ilaçların ise amorf hale dönüşebildiği bilinmektedir. (83, 168). Literatür bilgileri ışığında nanokristal formülasyonlarında etkin maddenin vermiş olduğu yerde herhangi bir erime pikinin gözlenmemesinin ilacın poloksamer 188 ile kaplanmasına, formülasyon içinde düşük miktarda olmasına ve amorf hale dönüşmesine bağlı olabileceği düşünülmektedir. M3-NK'nın SEM görüntülerinde ince uzun partikül görüntülerinden ziyade daha yuvarlak ve tekdüze yapıların varlığı ve XRD difraktogramlarında herhangi bir pikin gözlenmemesi de etkin maddenin M3-NK formülasyonu içinde kristal yapıdan ziyade amorf yapıda olduğunu desteklemektedir.

Gulsun ve ark., (99) hazırladıkları furosemid nanosüspansiyonlarının DSC analizleri sonucunda elde edilen termogramlardaki etkin madde pikinin (210°C) kaybolmasını etkin maddenin sürfaktanlar ile tamamen kaplanmasına dayandırmıştır. Chalikwar ve ark. (83) yapmış oldukları bir çalışmada, nimodipin'in 125°C'deki erime pikinin katı lipid nanopartikül formülasyonlarının termogramlarında kaybolmasını etkin maddenin formülasyon içinde amorf halde olmasına bağlamıştır. Xia ve ark.'nın (71) yapmış olduğu bir diğer çalışmada ise, DSC bulguları neticesinde nitrendipin nanosüspansiyonlarında kristal yapının korunduğu bildirilmiştir.

Pullulanın DSC termogramı (Bkz. Şekil 4.31. ve Şekil 4.35.) incelendiğinde 322,73°C'de endotermik bir pik verdiği görülmekte olup sonuçların literatür ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir (198). M3-NK, aspartam ve pullulanı içeren FK-

2'nin DSC termogramı (Bkz. Şekil 4.32. ve Şekil 4.35.) incelendiğinde ise, karışımın 292,39°C'de düşük şiddette endotermik bir pik verdiği, bu pikin biraz kaymış olmakla birlikte M3-NK'nın erime piki (280,64°C) ile benzer olduğu görülmüştür. Çözücü dökme yöntemine göre hazırlanan M3-ADF formülasyonlarının DSC termogramlarında (Bkz. Şekil 4.33 ve Şekil 4.35.) M3-NK'nın erime pikinin kaybolması ve 320,68°C'de pullulanın erime pikine benzer geniş ve düşük şiddetli endotermik bir pikin varlığı M3-NK'nın ADF içinde film oluşturucu polimer olan pullulan ile kaplandığını göstermiştir. Pezik ve ark. (198) yapmış oldukları bir çalışmada, amlodipin besilat içeren pullulan bazlı ADF formülasyonları hazırlamış ve elde edilen optimum formülasyonların DSC termogramlarında 202,95°C'de gözlenen etkin madde pikinin kaybolmasını etkin maddenin pullulan ile tamamen kaplanmasına dayandırmıştır.

Elde edilen tüm DSC analiz sonuçları nanokristal formülasyonu ve ADF formülasyonu hazırlamak için kullanılan yöntemlerin (çöktürme ve ultrasonikasyon, çözücü dökme) M3'ün yapısını ve termal davranışlarını etkilediğini göstermiştir.

5.9.3. X-Işını Kırınımı Analizi

XRD analizleri maddelerin kristal veya amorf yapılarının aydınlatılmasında sıklıkla tercih edilen bir analiz yöntemidir. XRD analizlerinde madde üzerine gönderilen X-ışınının herhangi bir saçılım gösterip göstermemesine bağlı olarak elde edilen difraktogram pikleri yorumlanmaktadır. Amorf yapıdaki maddelerin herhangi bir saçılım piki göstermezken kristal yapıdaki maddelerin kristal örgüsüne spesifik tekrarlanabilir bir pik deseni verdiği bilinmektedir. Kristal yapıların raf ömürleri boyunca amorf yapılara kıyasla daha dayanıklı olmasına karşın amorf yapıların çözünme profillerinde daha iyi bir artış sağlaması formülasyon çalışmaları açısından yapının aydınlatılması gerekliliğini doğurmuştur. Özellikle amorf yapıların sistem içinde zamanla kristal yapıya geçme eğiliminin sistemin termodinamik açıdan dayanıklılığı, çözünürlüğü ve salım profili gibi birçok özelliğini etkileyebileceğinden formülasyon çalışmaları açısından oldukça önemlidir (168, 283).

Nanokristal ve ADF formülasyonlarında bulunan M3'ün kristal yapıda olup olmadığının, var olan kristal yapıda herhangi bir azalma olup olmadığının ve olası bir

kristal - amorf yapı dönüşümünün tespit edilebilmesi amacıyla M3, poloksamer 188, pullulan, hazırlanan formülasyonlar (M3-NK ve M3-ADF) ve bu formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddeleri içeren fiziksel karışımlar (FK-1 ve FK-2) için XRD analizleri yapılmıştır. M3'ün XRD difraktogramı incelendiğinde özellikle 7° civarında gözlenen keskin pikin ve $5-20^\circ$ aralığında gözlenen tekrarlı pik deseninin varlığı ticari DHP'lere benzerlik göstermekle birlikte etkin maddenin kristal yapısını işaret etmektedir (Bkz.Şekil 4.5. ve Şekil 4.42.) (66, 71, 174, 257). Poloksamer 188'in XRD difraktogramında (Bkz.Şekil 4.36. ve Şekil 4.42.) $19,14^\circ$ ve $23,33^\circ$ 'de tespit edilen iki şiddetli pik literatür ile uyumlu bulunmuş olup yapının kristal olduğunu göstermektedir (280). M3 ve poloksamer 188'i içeren FK-1'in XRD difraktogramı incelendiğinde (Bkz.Şekil 4.37. ve Şekil 4.42.), poloksamer 188'e ait piklerin aynı yerde ve aynı şiddette yer aldığı görülürken M3'e ait piklerden sadece 7° civarında gözlenen keskin pik, şiddeti azalmış bir şekilde görülmektedir. M3'ün diğer piklerinin gözlenmemesi ve gözlenen pik şiddetinin azalması FK-1 içinde bulunan M3'ün poloksamer 188'e kıyasla çok daha az miktarda olmasına bağlanmaktadır. Çöktürme ve ultrasonikasyon yöntemlerinin kombinasyonu ile hazırlanan M3-NK formülasyonlarının XRD difraktogramlarında (Bkz.Şekil 4.38. ve Şekil 4.42) 10° ve 25° aralığında çok küçük şiddette gözlenen piklerin haricinde şiddetli herhangi bir kırınım piki gözlenmemiş olup bu sonuç sistem içindeki etkin maddenin amorf yapıya dönüşmesi ile ilişkilendirilmiştir. SEM ve DSC analiz bulguları da bu sonucu destekler niteliktedir. 10° ve 25° aralığındaki oldukça düşük şiddetli pik deseninin ise nanosüspansiyonların liyofilizasyonu sırasında kullanılan trehalozun pik deseni ile (Bkz. Şekil 4.44.) örtüşmekte olduğu için trehaloz moleküllerine ait olduğu düşünülmektedir (284).

Pullulanın XRD difraktogramında (Bkz.Şekil 4.39 ve Şekil 4.43) yapının amorf olduğunu kanıtlar nitelikte herhangi bir kırınım piki gözlenmemiştir ve elde edilen difraktogram literatür ile uyumlu bulunmuştur (285). M3-NK, pullulan ve aspartamı içeren FK-2'nin XRD difraktogramı (Bkz. Şekil 4.40., Şekil 4.43. ve Şekil 4.44.) pullulanın X-ışını kırınımı deseni ile örtüşmektedir. Fakat grafik üzerinde $10^\circ-25^\circ$ aralığında olup $23,33^\circ$ 'deki diğerlerine kıyasla daha şiddetli olmak üzere çok küçük şiddette piklerin varlığı dikkat çekmiştir. Bu piklerin hemen hemen hepsi M3-NK formülasyonlarında da gözlenmiş olup nanosüspansiyonların kurutulması

amacıyla kullanılan trehaloz molekülüne ait olduğu düşünülmektedir. Trehalozun XRD kırınım pikleri ile FK-2'nin XRD difraktogramı üst üste karşılaştırıldığında (Bkz. Şekil 4.44.) piklerin neredeyse birebir hepsinin FK-2'nin difraktogramındaki piklere karşılık gelmesi bu sonucu destekler niteliktedir. Ayrıca literatürde trehaloz'un 23°-24° arasında daha şiddetli bir pik olmakla birlikte 12°-26° aralığında tekrarlı pik desenleri verdiği bildirilmiştir (284). M3-ADF formülasyonlarının XRD difraktogramı incelendiğinde (Bkz. Şekil 4.41. ve Şekil 4.44.) pullulan ve FK-2'ile benzer fakat daha az şiddette yayvan bir grafik görüntüsü elde edilmiş olup herhangi bir kırınım piki gözlenmemiştir. Ayrıca FK-2'de gözlenen piklerinin de kaybolduğu görülmekte olup tüm bu sonuçlar film içinde bulunan M3-NK'nın amorf yapısı ile ilişkilendirilmiştir. SEM ve DSC bulguları da M3-NK içindeki etkin maddenin amorf yapısını desteklemektedir.

5.9.4. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi Analizleri

FT-IR analizleri formülasyon bileşimindeki maddelerin etkileşiminin ve kullanılan yardımcı maddelerin etkin maddenin kimyasal stabilitesi üzerine etkisinin incelenmesinde kullanılan analizlerdir. FT-IR analizleri ile bileşiklerin yapılarındaki fonksiyonel gruplar, yapıdaki bağların durumu, bağlanma yerleri ve yapının aromatik ya da alifatik olup olmadığı belirlenebilmektedir. Etkin maddeye ait yapısal değişikliklerin incelenebilmesi için M3, poloksamer 188, trehaloz, pullulan, aspartam, hazırlanan formülasyonlar (M3-NK ve M3-ADF) ve bu formülasyonlarda kullanılan yardımcı maddeleri içeren fiziksel karışımlar (FK-1 ve FK-2) için FT-IR analizleri yapılmıştır.

M3'ün FT-IR spektrumunda 3311,32 - 3249,59 - 2969,71 - 2157,05 - 1652,82 - 1589,12 - 1518,94 - 1486,54 - 1469,28 - 1435,16 - 1378,21 - 1330,73 - 1293,97 - 1277,79 - 1217,98 - 1141,81 - 1113,61 - 1067,32 - 984,82 - 958,15 - 834,91 - 769,95 - 739,40 - 694,88 - 638,84 cm^{-1} 'de görülen karakteristik pikler molekülün sahip olduğu fonksiyonel gruplar (3300 cm^{-1} ve 3200 cm^{-1} civarında hidroksil (O-H) ve amin (N-H) bağlarına ait gerilim bantları; 1600-1500 cm^{-1} 'de karbonil (C=O) ve çift bağ (C=C) gerilim bantları; 1300- 1000 cm^{-1} civarında ester grubunun güçlü (C-O) gerilim bantları; 1000 cm^{-1} ve 800 cm^{-1} civarında p-disübstitüe benzen gerilim bantları) ile uyumlu bulunmuştur (Bkz.Şekil 4.6. ve Şekil 4.53). Ayrıca M3'e ilişkin

elde edilen FT-IR spektrumunda karakteristik fonksiyonel gruplara ait piklerin ticari DHP türevlerinininkine benzer olduğu görülmektedir (66, 174). Poloksamer 188'in FT-IR spektrumu incelendiğinde (Bkz.Şekil 4.45. ve Şekil 4.53.) tespit edilen karakteristik gerilim bantlarının sırasıyla 2881,25 cm^{-1} 'deki O-H (hidroksil) ve 1060,29 cm^{-1} 'deki C-O (karbonil) gruplarına ait bantlar olduğu görülmüş olup elde edilen sonuçlar literatür ile uyumlu bulunmuştur (286, 287). Trehalozun FT-IR spektrumunda (Bkz.Şekil 4.46.) ise literatür verilerini destekler nitelikte 3266,38 cm^{-1} 'deki O-H (hidroksil) ve 996,13 cm^{-1} 'deki C-O (ester grubunun güçlü bağları) gruplarına ait gerilim bantları görülmüştür (288). M3 ve poloksamer 188'i içeren FK-1'in FT-IR spektrumunda (Bkz.Şekil 4.47. ve Şekil 4.53.) 2883,35 - 1341,77 - 1060,4 - 961,27 - 841,69 cm^{-1} 'de görülen karakteristik gerilim bantlarının poloksamer 188'in spektrumundaki gerilim bantları (2881,25 - 1341,96 - 1060,29 - 961,61 - 841,76 cm^{-1}) ile neredeyse aynı yerde olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında 3308,26 - 1655,28 ve 1589,75 cm^{-1} 'deki gerilim bantlarının M3'ün spektrumundaki gerilim bantları ile (3311,32 - 1652,82 ve 1589,12 cm^{-1}) örtüşmesi nedeniyle M3'deki fonksiyonel gruplara ait olduğu düşünülmektedir. Bu gerilim bantlarının düşük şiddette gözlenmesi XRD ve DSC analizlerinde olduğu gibi FK-1 içinde bulunan M3'ün poloksamer 188'e kıyasla çok daha az miktarda olmasına bağlanmaktadır. Sonuç olarak, FK-1'in FT-IR spektrumunun bileşimindeki maddeleri yansıttığı tespit edilmiştir. Çöktürme ve ultrasonikasyon yöntemlerinin kombinasyonu ile hazırlanan M3-NK formülasyonlarının FT-IR spektrumunda (Bkz.Şekil 4.48., Şekil 4.53. ve Şekil 4.54.) 3305,77 cm^{-1} 'de M3'e ait ve 2890,76 cm^{-1} 'de poloksamer 188'e ait karakteristik bantlar görülmüştür. Elde edilen tüm bu sonuçlar M3'ün kullanılan stabilizan ile herhangi bir etkileşiminin olmadığını ve nanokristal bileşiminin yanı sıra hazırlama tekniğinin M3'ün kimyasal stabilitesi üzerinde görünen herhangi bir etkisinin olmadığını göstermiştir.

Pullulanın FT-IR spektrumu incelendiğinde (Bkz.Şekil 4.49. ve Şekil 4.54.) tespit edilen karakteristik gerilim bantlarının sırasıyla 3326,46 cm^{-1} 'deki O-H (hidroksil), 1638,18 cm^{-1} 'deki C=O (karbonil) ve 995,34 cm^{-1} 'deki C-O (ester gruplarına ait güçlü bağ) gruplarına ait bantlar olduğu görülmüş olup elde edilen sonuçlar literatür ile uyumlu bulunmuştur (285). Aspartamın FT-IR spektrumunda (Bkz.Şekil 4.50.) ise literatür verilerini destekler nitelikte 3321,61 cm^{-1} 'deki O-H

(hidroksil) ve N-H (amin), 1736,04 - 1664,80 - 1536,07 cm^{-1} 'deki C=O (karbonil) ve C=C (çift bağ), 1360,16 cm^{-1} 'deki C-O (ester gruplarına ait güçlü bağ) ve 697,56 cm^{-1} 'deki disüstitüe benzen gruplarına ait gerilim bantları görülmüştür (289). M3-NK, pullulan ve aspartamı içeren FK-2'nin FT-IR spektrumu incelendiğinde (Bkz. Şekil 4.51. ve Şekil 4.54.) M3-NK'dan farklı olarak 1736,06 ve 1664,98 cm^{-1} 'deki gerilim bantları dikkat çekmiştir. Bu bantların M3-NK bileşiminde bulunan aspartamdaki fonksiyonel gruplara ait olduğu gerilim bantlarının (1736,04 - 1664,80 cm^{-1}) hemen hemen aynı olmasından anlaşılmaktadır. Çözücü dökme yöntemine göre hazırlanan M3-ADF formülasyonlarının FT-IR spektrumunu incelendiğinde (Bkz. Şekil 4.52. ve Şekil 4.54.) ise M3-NK ve pullulanın spektrumlarını yansıttığı görülmüş olup ve ADF formülasyonu üretim tekniğinin hazırlanan M3-NK ve M3'ün kimyasal stabilitesi üzerinde görünen herhangi bir etkisinin olmadığını göstermiştir.

5.10. Stabilite Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi

İlaç şekillerinin tasarımında ve geliştirilmesinde dikkat edilmesi gereken en önemli unsurlardan birisi dozaj formu içindeki etkin maddenin ve sonuç ürünün stabilitesidir. Bir ilacın dayanıklı olması, üretim, depolama, nakil, saklama ve kullanım süresi boyunca üretildiği tarihteki özelliklerinin önceden belirlenmiş sınırlar içinde kalması en önemli kalite göstergelerinden biridir.

M3-ADF formülasyonlarının kısa süreli hızlandırılmış stabilite çalışmaları Bölüm 3.2.8.'de (Bkz. Bölüm 3.2.8.) belirtildiği şekilde 30 gün boyunca gerçekleştirilmiş olup periyodik aralıklar (0, 15. ve 30. gün) ile alınan örnekler morfolojik özellikleri, kütle tekdüzeliği, kalınlık değerleri, yüzey pH'ı, nem tayini, içerik tekdüzeliği ve dağılma (petri kabı yöntemi ve damla yöntemi) süreleri analiz edilerek ADF karakterizasyon özellikleri açısından değerlendirilmiştir. M3-NK yüklü pullulan bazlı ADF'lerin ağırlık bulguları haricindeki diğer karakterizasyon çalışma bulgularında istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik olmaksızın belirlenen süre boyunca $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $\%75 \pm 5$ nem koşullarında stabil olduğu saptanmıştır (Bkz.Tablo 4.32.).

Kütle tekdüzeliği bulgularına göre, başlangıçta $79,05 \pm 1,3$ mg olan filmlerin ortalama ağırlığı, 15. gün sonunda $80,59 \pm 1,6$ mg ve 30. gün sonunda ise $81,74 \pm 1,6$

mg olarak belirlenmiştir (Bkz. Tablo 4.26). 0. gün, 15. gün ve 30. gün kütle tekdüzeliği sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığı “*Tek Yönlü Varyans Analizi (One Way ANOVA)*” ile test edilmiştir. Farklı grupların belirlenmesi amacıyla ise “*Tukey HSD Yöntemi*” kullanılmıştır. Tek yönlü varyans analiz sonuçları ADF formülasyonlarının farklı zamanlardaki ağırlık sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunduğunu ($p < 0,05$) gösterirken *Tukey HSD Yöntemi* bu farkın 0. gün-15. gün ve 0. gün-30. gün arasında olduğunu, 15. gün-30. gün arasında anlamlı bir fark bulunmadığını göstermiştir. Sonuçlar ağırlık değişkenliğinin 30 gün sonunda belli bir noktada sabitlendiğini göstermiş olup film ağırlığındaki değişme, filmlerin % nem oranlarındaki artış ile ilişkilendirilmiştir. Stabilitate çalışmaları sonucunda elde edilen kütle tekdüzeliği bulguları Avrupa Farmakopesi’ne uygunluk açısından değerlendirilmiştir. Avrupa Farmakopesi’ne göre; film ağırlığı 80 mg’dan az ise; ikiden fazla filmin ağırlığının ortalama film ağırlığının %10 sapma değerinden fazla olmaması ve hiçbir filmin ağırlığının bu %sapma değerinin iki katından fazla olmaması gerekmektedir. Film ağırlığı 80 mg ve 250 mg arasında ise aynı kriterler sapma değeri %7,5 değerine göre değerlendirmelidir. M3-ADF formülasyonlarının üretilir üretilmez yapılan karakterizasyon çalışmaları ağırlıklarının 80 mg’dan az ($79,05 \pm 1,3$ mg) olduğunu göstermiş olup Avrupa Farmakopesi gereklilikleri %10 sapma değerleri temel alınarak değerlendirilmiştir. Stabilitate çalışmaları sonuçlarına göre 15. gün ($80,59 \pm 1,57$ mg) ve 30. gün ($81,74 \pm 1,56$ mg) film ağırlıkları 80 mg’dan yüksek olduğu için %7,5 sapma değerleri temel alınarak hesaplamalar yapılmıştır. Her üç zaman noktası için de elde edilen değerlerin farmakope gerekliliklerini sağladığı saptanmıştır (Bkz. Tablo 4.26.).

Film kalınlık bulgularına göre, başlangıçta $0,129 \pm 0,003$ mm olan filmlerin ortalama kalınlığı 15. gün sonunda $0,130 \pm 0,002$ mm ve 30. gün sonunda ise $0,130 \pm 0,003$ mm olarak ölçülmüştür (Bkz. Tablo 4.27). 15. gün ve 30. gün için %BSS değerleri sırasıyla %1,853 ve %1,946 olarak hesaplanmıştır. Ortalama film kalınlık bulguları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmaz iken ($p > 0,05$) %BSS değerlerinin de %5’in altında olduğu görülmektedir.

Başlangıçta %6,58 olan M3-ADF formülasyonlarının % nem bulguları 15. ve 30. gün sonunda sırasıyla %6,72 ve %6,92 olarak ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre filmlerin az da olsa nem değerlerinde artış gözlenmiş olup filmlerin biraz yapışkan hale gelmesi ve ağırlık değerlerindeki anlamlı artışın, filmlerin % nem oranının artmasına bağlı olarak gerçekleşmiş olabileceği düşünülmektedir. Kısa süreli hızlandırılmış stabilite çalışmaları kapsamında filmlerin elde edilen yüzey pH bulguları (Bkz. Tablo 4.28.) başlangıçtaki değerlerine ($6,29 \pm 0,10$) kıyasla değerlendirilmiştir. 15. gün ve 30. gün sonunda filmlerin yüzey pH değerleri sırasıyla $6,22 \pm 0,06$ ve $6,19 \pm 0,09$ olarak ölçülürken günler arasında istatistiksel olarak anlamlı herhangi fark saptanmamıştır ($p>0,05$).

M3-ADF formülasyonlarının içerdiği % ortalama ilaç miktarları 15. ve 30. gün sonunda sırasıyla $93,97 \pm 2,44$ ve $95,2 \pm 3,74$ olarak hesaplanmış olup içerik tekdüzeliği bulguları arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$). Elde edilen içerik tekdüzeliği sonuçları (Bkz. Tablo 4.29.) farmakope gerekliliklerine uygunluk açısından değerlendirilmiştir. Buna göre; hazırlanan M3-ADF formülasyonlarının 15. ve 30. gün sonunda içerik tekdüzelikleri sırasıyla %90,46-%96,99 ve %90,01-103,41 arasında tespit edilmiş olup %BSS değerleri sırasıyla %2,6 ve %3,9 olarak saptanmıştır (Bkz. Tablo 4.29.). Ayrıca Amerikan Farmakopesi'nde belirtilen koşullara göre yapılan hesaplamalar sonucunda 15. ve 30. gün için kabul değerleri 10,99 ve 12,28 olarak tespit edilmiştir (202). Stabilite çalışma sonuçlarına göre her bir zaman noktası için hazırlanan her bir M3-ADF formülasyonundaki ilaç miktarı, Amerikan Farmakopesi'nde ticari bir DHP türevi olan amlodipin besilat için verilen limit değerler olan % 90 - % 110 aralığında, %BSS değeri % 6'dan küçük ve kabul değerleri 15'in altında olarak saptanmıştır. Sonuç olarak, elde edilen bulgular hazırlanan M3-ADF formülasyonlarının belirlenen süre boyunca farmakope gerekliliklerini de sağlayarak kısa süreli stabilitesini koruduğunu göstermektedir.

Stabilite çalışmaları kapsamında M3-ADF formülasyonlarının distile su ve pH 5,7 yapay tükürük sıvısı ortamlarında, petri kabı yöntemi ve damla yöntemi olmak üzere iki farklı yöntemle göre dağılma süreleri tespit edilmiştir (Bkz. Tablo 4.30. ve Tablo 4.31.). Elde edilen sonuçlar, her ortam için farklı zaman süreleriyle (0.

gün-15. gün ve 30. gün) kendi içinde ve her zaman noktası için farklı ortamlar arasında kıyaslanmıştır. Genel olarak her iki ortam için de zamanla dağılma sürelerinde çok az bir azalış gözlenirken bu azalışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ve farklı ortamlar arasında da anlamlı bir farkın bulunmadığı sonucuna varılmıştır ($p>0,05$). Distile su ile yapılan dağılma testi sonuçlarına göre 15. ve 30. gün dağılma süreleri; petri kabı yöntemine göre; $20,5 \pm 2,8$ sn ve $19,3 \pm 1,5$ sn ve damla yöntemine göre; $11,2 \pm 1,1$ sn ve $11,5 \pm 1,7$ sn olarak ölçülmüştür (Bkz. Tablo 4.30.). pH 5,7 yapay tükürük sıvısı ile yapılan dağılma testi sonuçlarına göre ise 15.ve 30.gün dağılma süreleri; petri kabı yöntemine göre; $20,5 \pm 2,8$ sn, $19,3 \pm 1,5$ sn ve damla yöntemine göre; $11,2 \pm 1,1$ sn, $11,5 \pm 1,7$ sn olarak saptanmıştır (Bkz. Tablo 4.31.). Stabilité çalışmaları sonucu elde edilen tüm bulgular, hazırlanan M3-ADF formülasyonlarının $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ve $\%75 \pm 5$ nem koşullarında 30 gün boyunca stabilitesini farmakope sınırları içinde koruduğunu göstermiştir.

5.11. Hücre Kültürü Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Hücre kültürü çalışmaları, biyolojik ortamı taklit eden hücrelerin ve buna bağlı olarak in vivo fizyolojik ortam için gerçeğe yakın sonuçların elde edilebilmesi sayesinde pahalı, zaman alıcı ve etik kurul izni gerektiren in vivo hayvan deneyi çalışmalarına alternatif çalışmalar olarak son zamanlarda sıklıkla tercih edilmektedir (290). Hücre kültürü çalışmaları ilaçların taşınması (membran geçişleri) ve metabolizasyonunun belirlenmesinin yanı sıra çeşitli inhibitörlerin ve diğer metabolik faktörlerin incelenmesine de olanak sağlamaktadır (237, 291, 292).

İlaç molekülleri biyolojik ortama alındıktan sonra uygulama yoluna bağlı olarak farklı fiziksel bariyer ve ortamlar ile karşılaşmaktadır. Bir ilacın dokuya geçerken karşılaşacağı ilk bariyer sıkıca dizilmiş hücrelerden oluşan tekli veya çoklu hücre tabakaları olduğu için hücre kültürü çalışmalarında seçilecek olan hücre kültürü modelinin çalışmaya uygun fiziksel bariyer ve biyokimyasal ortamı temsil ediyor olması oldukça önemlidir (237, 292). Caco-2 hücreleri belli bir büyüme prosesinden sonra (yarı-geçirgen membranlar üzerine ekildikten yaklaşık 21-28 gün sonra), apikal ve bazolateral bölgeleri içeren tek katmanlı polarize tabaka formunu almaktadır. Ayrıca Caco-2 hücrelerinin fırçamsı yapıdaki mikrovillileri, sıkı

kavşakları, P-gp ve çeşitli efflux pompa ve enzimlerine sahip olması, hücrelere ince bağırsağın yapısını taklit edebilme özelliği kazandırmıştır (293).

Oral yolla uygulanan ilaçların biyoyararlanımının belirlenmesinde gastrointestinal kanaldan geçiş (permeabilite) anahtar faktörlerden biri olup bir etkin maddenin geçirgenlik derecesinin belirlenmesinde farklı ölçüm yöntemleri kullanılabilir (239). Tez çalışmaları kapsamında bu amaçla önerilen yöntemlerden “epitel kültür hücrelerinin tekli tabakasında permeasyon çalışmaları” tercih edilmiş ve bu amaçla Caco-2 hücreleri ile çalışılmıştır.

5.11.1. M3’ün Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi’ndeki Yerinin Tespit Edilmesi

M3’ün in vitro permeabilite çalışmalarında kullanılacak güvenli dozun belirlenebilmesi amacıyla yapılan sitotoksikite çalışma sonuçlarında, DMSO kontrolleri için yüzde arttıkça her ne kadar hücre canlılığında azalma görülse de saptanan bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Artan M3 konsantrasyonları için ise, DMSO kontrollerinde olduğu gibi hücre canlılığında azalma saptanmış olup 200 $\mu\text{g/mL}$ ve 1000 $\mu\text{g/mL}$ ilaç konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p<0,05$). Fakat hem DMSO kontrolleri hem de M3 için tüm dozlarda/yüzdelerde hücre canlılığının %80’den yüksek olması, seçilecek her ilaç dozu ve DMSO yüzdesi için Caco-2 hücreleri üzerinde toksik bir etkinin gözlenmeyeceğini işaret etmektedir (Bkz. Tablo 4.33. ve Şekil 4.58.). Sitotoksikite çalışmaları M3’ün BCS’deki yerinin tespiti için yapılacak ön permeabilite çalışmalarında 200 $\mu\text{g/mL}$ ve 1200 $\mu\text{g/mL}$ arasında herhangi bir ilaç dozunun seçilebileceğini göstermiştir. Bu nedenle hem Caco-2 hücrelerinde toksik bir etkiye neden olmaması hem de kılavuzun önerdiği üzere M3’ün geçirgenlik çalışmalarında kullanılmak üzere 360 $\mu\text{g/mL}$ ’lik M3 dozu (en yüksek tek terapötik doza sahip olan ticarileşmiş aynı türev etkin maddenin dozunun (Nifedipin’in en yüksek oral terapötik dozu = 90 mg) 250 mL (yaklaşık bir bardak su hacmi)’ye bölünmesiyle elde edilen konsantrasyon değeri) seçilmiştir.

M3’ün BCS’deki yerinin tespiti için yapılacak transport çalışmalarına başlamadan önce büyütülen Caco-2 hücrelerinin tek tabaka hücre bütünlüğünün

değerlendirilmesi amacıyla TEER değerleri ölçülmüş ve genel olarak 200-1000 ohm.cm² arasında tespit edilmiştir. Literatürde TEER değerleri ve gastrointestinal epitel hücrelerin tek tabaka bütünlüğü arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir. 2000 ohm.cm²'nin üzerinde TEER değerine sahip olan epitel hücreler “sıkı”; 50-100 ohm.cm² arasında TEER değerine sahip olan epitel hücreler “gevşek” ve 300-400 ohm.cm² arasında TEER değerine sahip olan hücreler ise “orta sıkı” epitel hücreler olarak sınıflandırılmıştır (234-237). Biyolojik ortamın tam olarak taklit edilebilmesi amacıyla TEER<400 ohm.cm² olan hücreler transport çalışmalarında kullanılmamıştır. Transport çalışmaları sonucunda elde edilen bazolateral örnekleri valide HPLC miktar tayin yöntemi ile analiz edilmiş ve M3'ün permeabilite katsayısı (P_{app}) $2,17 (\pm 0,07) \times 10^{-7}$ cm/sn olarak hesaplanmıştır.

CDER tarafından 2017 yılında yayınlanan kılavuzda permeabilite katsayılarından yola çıkarak ilaç geçirgenliğinin değerlendirilmesine ilişkin açık ve net ifadelerin (laboratuvarlar arası değişkenlikler ve deney prosedürlerinin farklılık göstermesi sebebi ile) yer almaması nedeniyle değerlendirmeler literatür bilgilerine dayandırılarak yapılmıştır. Artursson ve ark. (294) yapmış oldukları bir çalışmada in vivo biyoyararlanım bulguları ile in vitro permeabilite katsayıları (P_{app}) arasında iyi bir korelasyon olduğunu bildirmiştir. Lennernas ve ark. (295) tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise farklı emilim mekanizmalarına (pasif geçiş ve taşıyıcı aracılı geçiş) sahip ilaçların Caco-2 hücre kültürü çalışmaları ve in vivo biyoyararlanım çalışmalardan elde edilen sonuçlar karşılaştırmıştır. Elde edilen bulgular naproksen, metoprolol gibi pasif geçişle emilen lipofilik ilaçlar için her iki yöntemle tayin edilen permeabilite katsayılarının karşılaştırılabilir olduğunu göstermiştir.

Yee, (296) yapmış olduğu bir çalışmada etkin maddeleri Caco-2 hücrelerinden permeabilitelerine göre zayıf (oral absorpsiyon yüzdesi %0-20; P_{app} < 1×10^{-6} cm/sn), orta (oral absorpsiyon yüzdesi %20-70; P_{app} : $1-10 \times 10^{-6}$ cm/sn) ve iyi (oral absorpsiyon yüzdesi %70-100; P_{app} > 10×10^{-6} cm/sn) derecede emilen maddeler olarak sınıflandırmıştır. Kogan ve ark. (297) yapmış olduğu bir çalışmada genel olarak P_{app} değeri 1×10^{-6} cm/sn'den daha düşük olan maddelerin; düşük geçirgenliğe, 1×10^{-5} cm/sn'den küçük olan maddelerin; orta geçirgenliğe ve 1×10^{-5} cm/sn'den büyük olan maddelerin ise yüksek geçirgenliğe sahip olduğunu bildirmiştir.

Yazdanian ve ark. (298) ise; permeabilite katsayısı $0,4 \times 10^{-6}$ cm/sn değerinin altında olan moleküllerin oral emilimlerinin çok zayıf, 7×10^{-6} cm/sn değerinin üstünde olan moleküllerin ise oral emilimlerinin çok iyi olduğunu belirtmiştir. Tüm bu kriterler temel alındığında M3'ün ($P_{app} = 2,17 (\pm 0,07) \times 10^{-7}$ cm/sn $< 1 \times 10^{-6}$ cm/sn ve $P_{app} = 2,17 (\pm 0,07) \times 10^{-7}$ cm/sn $< 0,4 \times 10^{-6}$ cm/sn) çoğu ticarilerileşmiş DHP türevinden farklı olarak (Ticarilerileşmiş birçok DHP türevi Sınıf 2'de yer almaktadır) düşük geçirgenliğe sahip olduğu tespit edilmiştir (Bkz. Tablo 4.34.).

BCS'ne göre hemen salım sağlayan sistemlerde kullanılan ilaçların absorpsiyon hızı ve oranı, ilacın vücut sıvılarındaki çözünürlüğüne ve intestinal permeabilitesine bağlıdır. Bu özelliklere göre ilaçlar dört ana sınıfta değerlendirilmiştir. Yüksek çözünürlük/yüksek permeabilite gösteren ilaçlar, Sınıf 1; düşük çözünürlük/yüksek permeabilite gösteren ilaçlar, Sınıf 2; yüksek çözünürlük/düşük permeabilite gösteren ilaçlar, Sınıf 3 ve düşük çözünürlük/düşük permeabilite gösteren ilaçlar ise, Sınıf 4'de yer almaktadır (298). Çözünürlük ve permeabilite çalışma bulgularına göre M3'ün düşük çözünürlük ve düşük permeabilite özelliklerine sahip olması nedeni ile BCS'nde Sınıf 4'de yer aldığı düşünülmektedir.

5.11.2. Farklı Stabilizanların M3 Nanosüspansiyon Formülasyonlarının İn Vitro Sitotoksosite Profili Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Nanokristal formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan farklı stabilizanların M3 nanosüspansiyonlarının hücre canlılığı üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla yapılan hücre kültürü çalışma bulguları genellikle tüm örnekler (M3 ve %0,5 stabilizan içeren M3 nanosüspansiyonları) için uygulama dozu arttıkça hücre canlılığının azaldığını göstermiştir (Bkz. Tablo 4.35 ve Şekil 4.59.). Tüm uygulama süreleri için (24 saat, 48 saat ve 72 saat) M3'ün 250 µg/mL uygulama dozunda hücre canlılığının %40'ın altında saptanmış olması M3'ün yüksek dozlarda hücreler üzerindeki sitotoksitesini doğrulamıştır. SLS hariç tüm stabilizanlarla hazırlanan nanosüspansiyon formülasyonları için hücre canlılığının M3'e kıyasla daha yüksek olduğu görülmektedir. PVA ve PVP K30 ile hazırlanan nanosüspansiyon formülasyonlarında yüksek dozlarda hücre canlılığı %80'in altına düşerken, en iyi sonuçlar poloksamer 188, poloksamer 407 ve SoluPlus® ile

hazırlanan nanosüspansiyon formülasyonlarında elde edilmiştir. Poloksamerler kullanılarak hazırlanan nanosüspansiyonlarda en düşük partikül boyutlarının saptanmasının yanı sıra en iyi sitotoksosite profilinin elde edilmesi bu stabilizanların hücre zarında oluşan gözenekleri kapatarak hücre onarım mekanizmalarında rol oynaması ile ilişkilendirilmiştir (299-301). Ayrıca kullanılan maksimum DMSO yüzdesinde (%1,25) bile hücre canlılığının %80'in üzerinde olması kullanılan DMSO miktarlarının hücreler üzerinde ciddi bir toksik etkiye neden olmadığını göstermiştir (Bkz. Tablo 4.35. ve Şekil 4.60.).

5.11.3. M3 Nanokristal Formülasyonlarının Caco-2, MCF-7, SK-BR-3 ve A549 Hücrelerinin İn Vitro Hücre Canlılığı Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Literatürde yapısında DHP halkası taşıyan bileşiklerin çok sayıda farklı farmakolojik özelliklerine işaret edilmiştir. Vazodilatör, bronkodilatör, antiaritmik, antitüberküloz, antioksidan ve antitrombotik aktiviteler sergileyen DHP'lerin ayrıca antikanser, antibakteriyel ve antiviral aktiviteler de sergilediği bildirilmiştir (10, 241). Martin ve ark. (242) sentezledikleri bazı 1,4-DHP türevlerinin protein tirozin kinaz inhibitörü etki göstererek çeşitli kanser tiplerinin tedavisinde kullanılabileceğini göstermiştir. Zhang ve ark., (243) yapmış oldukları bir çalışmada sentezlemiş oldukları steroidal DHP türevlerinin farklı hücre hatları üzerinde antikanser etkinliklerini incelemiş ve bazı bileşiklerde antikanser aktiviteye rastladıklarını bildirmiştir. Tez kapsamında kullanılan M3 ve M3 nanokristal formülasyonlarının antikanser etkinliklerinin incelenmesi amacıyla farklı kanser hücre hatları (Caco-2, MCF-7, SK-BR-3 ve A549) üzerinde sitotoksosite çalışmaları yapılmıştır.

Farklı kanser hücre hatları üzerinde yapılan sitotoksosite çalışmaları sonucunda tüm hücre hatları için kullanılan maksimum DMSO'da (%1) bile hücre canlılığının %80'in üzerinde olması DMSO'nun hücreler üzerinde ciddi bir toksik etkiye neden olmadığını göstermiştir (Bkz. Tablo 4.36. ve Şekil 4.62.). Caco-2 hücreleri hariç tüm hücre hatlarında M3 dozu arttıkça hücre canlılığı azalmıştır. Ancak hücre canlılığı, MCF-7 hücreleri hariç tüm hücre hatları ve tüm örnekler için %80'in üzerinde saptanmıştır. MCF-7 hücre hattında, en yüksek (250 µg/mL) M3-NS dozu için hücre canlılığı %77,7 olarak tespit edilmiştir. Dört farklı hücre hattı

üzerinde yapılan sitotoksosite çalışmalarının sonuçları genel olarak, M3 ve M3 nanokristallerinin bu hücre hatları üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etkiye sahip olmadığını göstermiştir (Bkz. Tablo 4.36. ve Şekil 4.61).

5.11.4. Nanokristal ve Ağızda Dağılan Film Formülasyonların İn Vitro Geçirgenlik (Permeabilite) Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi

M3 üzerinde yapılan çözünürlük ve ön permeabilite çalışmaları ilacın hem çözünürlüğünün ($1,056 \pm 0,166 \mu\text{g/mL}$) hem de intestinal geçirgenliğinin ($P_{\text{app}}=2,17 \times 10^{-7} \text{ cm/sn}$) düşük olması nedeni ile BCS'ne göre Sınıf 4'de yer alabileceğini göstermiştir. Literatürde Sınıf 4'de yer alan ilaçlar için, formülasyon geliştirme çalışmalarında düşük çözünürlük ve permeabilite özellikleri nedeni ile her ne kadar zayıf adaylarmış gibi görünseler de Sınıf 2'de yer alan ilaçlar için kullanılan mevcut yaklaşımlar (çözünürlük artırma yöntemleri) ve permeasyon artırıcılar ile oldukça başarılı sonuçların alındığı bildirilmiştir (32). Bu amaçla NKT kullanılarak çözünürlük özellikleri iyileştirilen M3 nanokristal ve ağızda dağılan film formülasyonlarının M3'ün in vitro geçirgenliği üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla Caco-2 hücre hattı üzerinde sitotoksosite ve permeabilite çalışmaları yapılmıştır.

Sitotoksosite çalışmalarında M3, formülasyon bileşimini oluşturan karışımlar (FK-1, FK-2, plasebo ADF), formülasyonlar (M3-NS, M3-NK, M3-ADF) ve kontrollerin (Asiklovir, metaprolol tartarat ve DMSO kontrolleri) farklı konsantrasyonlarındaki ($37,5 - 50 - 75 - 100 - 150$ ve $200 \mu\text{g/mL}$) örneklerinden elde edilen bulgular, tüm örnekler için hücre canlılığının %80'in üzerinde olduğunu göstermiştir (Bkz. Tablo 4.37., Şekil 4.63.ve Şekil 4.64.). HPLC miktar tayinlerinde deteksiyon problemi yaşanmaması için toksik olmayan en yüksek doz ($200 \mu\text{g/mL}$) ile permeabilite çalışmalarına geçilmiştir.

İn vitro permeabilite çalışma bulgularına (Bkz. Tablo 4.38. ve Şekil 4.65.) göre; M3'ün permeabilite katsayısı $0,15 (\pm 0,01) \times 10^{-7} \text{ cm/sn}$ olarak saptanmış olup ön permeabilite çalışma sonuçları ($P_{\text{app}}=2,17 \times 10^{-7} \text{ cm/sn}$) ile benzerlik göstermektedir. M3'ün literatür sınıflandırmalarına göre düşük permeasyon göstermesi BCS'deki yerini (Sınıf 4) bir kez daha doğrulamıştır. M3 içeren

nanosüspansiyon (M3-NS), nanokristal (M3-NK) ve ağızda dağılan film (M3-ADF) formülasyonlarının permeabilite katsayıları $1,24 (\pm 0,07) \times 10^{-7}$ cm/sn, $4,26 (\pm 0,50) \times 10^{-7}$ cm/sn, $4,44 (\pm 0,10) \times 10^{-7}$ cm/sn olarak saptanmış olup M3'e kıyasla sırasıyla 8,3 - 28,6 - 29,8 kat artış olduğu görülmektedir ($p < 0,05$). M3 içeren formülasyonlar birbiri ile kıyaslandığında; M3-NS diğer formülasyonlardan belirgin derecede farklı iken ($p < 0,05$), M3-NK ve M3-ADF'nin permeabilite katsayıları arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p > 0,05$). Ayrıca in vitro permeabilite çalışmalarında deney prosedürünün uygun koşullarda ilerleyip ilerlemediğinin test edilebilmesi için düşük (asiklovir; negatif kontrol) ve yüksek (metaprolol tartarat; pozitif kontrol) permeasyon gösterdiği bilinen kontroller kullanılmıştır. Kontroller için elde edilen P_{app} değerlerinin (Asiklovir; $0,09 (\pm 7,72) \times 10^{-7}$ cm/sn, Metaprolol tartarat; $775,1 (\pm 5,76) \times 10^{-7}$ cm/sn) literatür ile uyumlu bulunması, çalışmanın istenilen şekilde gerçekleştirildiğini ve transport çalışması öncesi TEER değeri ölçümü ile test edilen Caco-2 hücrelerinin tek tabaka bütünlüğünün, intestinal hücre yapısını istenildiği gibi taklit ettiğini göstermiştir (239, 302).

NKT kullanılarak ilaçların çözünürlük özelliklerinin iyileştirilmesi sayesinde permeabilitede belirgin bir artış elde edilebildiği bilinmekte olup bu konuda birçok literatür örneği bulunmaktadır (168, 277). Pınar ve ark., (178) yapmış oldukları bir çalışmada, hazırladıkları siklosporin A nanosüspansiyonları ile ilacın permeabilitesinde yaklaşık 5 kat artış saptamıştır. Gülsün ve ark.'nın (261) yapmış olduğu bir diğer çalışmada ise, farklı yöntemler ile hazırlanan furosemid nanosüspansiyonlarında ilaca kıyasla Caco-2 hücrelerinden geçişin anlamlı şekilde arttığı bildirilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez kapsamında suda çözünürlük problemi olduğu bilinen ve hem L-tipi hem de T-tipi kalsiyum kanallarını bloke etme yeteneğine sahip bir molekül olan M3 ile çalışılmıştır. Tasarlanan M3 molekülünün daha başarılı bir klinik kontrol sağlaması nedeniyle HT tedavisinde yenilikçi bir yaklaşım olduğu bildirilmiştir. Çözünürlük problemi olan M3'ün yeni sentezlenmiş bir molekül olması sebebi ile öncelikle BCS'deki yerinin tespit edilmesi ve NKT ile çözünürlüğünün artırılması sonrasında ise konvansiyonel katı dozaj şekillerine kıyasla daha geniş bir hasta popülasyonuna hitap edeceği ve daha yüksek hasta uyuncuna ulaşılabileceğinin düşünüldüğü ADF formülasyonlarının geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla yapılan çalışmalarda aşağıdaki sonuçlara ulaşılmıştır.

- Fizikokimyasal çalışmalar ile M3'ün erime derecesi ve katı hal karakteristiği belirlenmiş olup ticarileşmiş DHP türevleri ile uyumlu olarak kristal yapıda ve mikron boyutunda olduğu tespit edilmiştir.
- Literatür bilgileri doğrultusunda M3'ün miktar tayini için doğru, kesin, tekrarlanabilir ve seçici bir HPLC in vitro miktar tayini yöntemi geliştirilmiştir.
- M3'ün BCS'deki yerinin tespiti için WHO 2018 ve CDER 2017 kılavuzları'nda önerildiği gibi çözünürlük ve permeabilite çalışmaları yapılmıştır. Dört farklı çözünme ortamında (su, pH 1,2, pH 4,5, pH 6,8) gerçekleştirilen çözünürlük çalışmaları ile M3'ün çözünürlüğünün ticarileşmiş DHP türevleri ile uyumlu olarak zayıf ve pH bağımlı olduğu tespit edilmiştir. İn vitro Caco-2 permeabilite çalışmalarına göre M3'ün permeabilite katsayısının çoğu ticarileşmiş DHP türevinden farklı olarak düşük olduğu ve sonuç olarak hem düşük çözünürlük hem de düşük permeabilite profili nedeni ile BCS'ne göre Sınıf 4'de yer aldığı belirlenmiştir.
- Önformülasyon çalışmalarında değişen yöntem koşullarına (farklı stabilizan yüzdesi, karıştırma hızı ve süresi, çöktürme sıcaklığı, sonikasyon gücü ve süresi ve ilaç konsantrasyonu) karşı formülasyon çıktıları değerlendirilmiş ve en uygun yöntem kombinasyonu belirlenmiştir. Değerlendirilen yöntem koşullarından karıştırma hızı haricindeki tüm parametrelerin M3

nanokristallerinin partikül büyüklüğü üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olduğu sonucuna varılmıştır.

- Belirlenen yöntem koşulları ile en uygun stabilizan türü ve oranının tespiti için yapılan formülasyon çalışmaları, genel olarak polimerik stabilizanlar (PVA, PVP K30, SoluPlus®), SDC ve SLS ile hazırlanan nanosüspansiyonların partikül büyüklüğünün mikron boyutunda, poloksamer 188 ve poloksamer 407 ile hazırlanan nanosüspansiyonların partikül büyüklüğünün ise nano boyutunda olduğunu göstermiştir. Ayrıca poloksamer 188 ve poloksamer 407 ile hazırlanan nanosüspansiyonlarının ZP değerlerinin yüksek fiziksel stabiliteyi doğrular şekilde hedeflenen aralıkta olduğu saptanmıştır. Ancak formülasyon parametreleri ile stabilizan konsantrasyonları arasında doğrusal bir ilişki saptanmamıştır. %0,5 poloksamer 188 ile hazırlanan M3 nanosüspansiyonları optimum nanosüspansiyon (M3-NS) olarak seçilmiştir.
- M3 nanosüspansiyonlarının kurutulması aşamasında kriyoprotektan varlığının etkisinin incelenmesi için farklı kriyoprotektan türü ve oranları ile formülasyon denemeleri yapılmıştır. Kriyoprotektan kullanılmayan formülasyonlarda genel olarak partikül büyüklüğü ve PDI değerlerinde artış ve ZP değerlerinde düşüş olduğu görülmüştür. Buna karşı yüksek oranda kriyoprotektan varlığının partikül büyüklüğünde azalma ve ZP değerlerinde artış sağlayarak formülasyon çıktılarını iyileştirdiği saptanmıştır.
- En iyi formülasyon çıktılarının elde edildiği %5 trehaloz ile dondurularak kurutulmuş %0,5 poloksamer 188 ile hazırlanan M3 nanokristal formülasyonları (M3-NK) ile pulluan bazlı ADF formülasyonları hazırlanmıştır. ADF formülasyonları üzerinde yapılan karakterizasyon çalışmaları oldukça hızlı dağılma sürelerine sahip ve farmakope standartlarına uygun filmlerin başarılı bir şekilde hazırlandığını göstermiştir.
- M3 nanokristalleri ile M3'ün çözünürlüğünde yaklaşık 200 kat artış elde edilmiştir.
- İn vitro çözünme hızı çalışmaları ile 60 dak. sonunda M3'ün %çözünen miktarının %8,34 iken nanokristal ve ADF formülasyonlarında %82,71 ve

%94,27 olduğu belirlenmiş ve çözünme profilinde hedeflenen iyileşmenin sağlandığı gösterilmiştir.

- M3-NK ve M3-ADF formülasyonları üzerinde yapılan fizikokimyasal çalışmalar M3'ün formülasyon içinde kristal hal karakteristiğinden amorf yapıya dönüştüğünü doğrulamış olup M3-ADF formülasyonları için yapılan kısa süreli hızlandırılmış stabilite çalışmaları pullulan bazlı ADF formülasyonlarının 4 hafta boyunca fiziksel stabilitesini koruduğunu göstermiştir. Ancak amorf yapıların formülasyon içinde zamanla kristal yapıya geçme eğiliminin sistemin termodinamik açıdan dayanıklılığı, çözünürlüğü ve salım profili gibi birçok formülasyon çıktısını etkileyebileceğinden uzun süreli stabilite testlerinin yapılması önerilmektedir.
- Nanokristal formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan farklı stabilizanların M3 nanosüspansiyonlarının hücre canlılığı üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla yapılan hücre kültürü çalışmaları ile M3'ün yüksek dozlardaki toksisite profilinin poloksamer 188, poloksamer 407 ve SoluPlus® bazlı nanokristal formülasyonları ile iyileştirilebileceği tespit edilmiştir.
- Literatürde yapısında DHP halkası taşıyan bileşiklerin çok sayıda farklı farmakolojik özelliklerinin yanında antikanser aktivite sergileyebildikleri ve ilerleyen zamanlarda çeşitli kanser tiplerinin tedavisinde kullanılabileceği bildirilmiştir. M3'ün ve M3 nanokristal formülasyonlarının antikanser etkinliklerinin incelenmesi amacıyla farklı kanser hücre hatları (Caco-2, MCF-7, SK-BR-3 ve A549) üzerinde 24 saat süre ile gerçekleştirilen sitotoksosite çalışmaları genel olarak, M3 ve M3 nanokristallerinin bu hücre hatları üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir sitotoksik etkiye sahip olmadığını göstermiştir. M3 ve M3 nanokristallerinin potansiyel antikanser etkilerini değerlendirmek için farklı kanser hücre hatları, farklı dozlar ve farklı inkübasyon sürelerinde daha ileri çalışmaların yapılması önerilmektedir.
- İn vitro Caco-2 permeabilite çalışmaları M3-NS, M3-NK ve M3-ADF formülasyonları ile M3'ün permeabilite katsayısında sırasıyla 8,3 - 28,6 - 29,8 kat artışın elde edildiğini ve böylece hedeflendiği gibi M3'ün

çözünürlük özellikleri ile ilişkili olarak geçirgenliğinin iyileştirildiğini göstermiştir.

Sonuç olarak tez kapsamında HT tedavisinde daha kapsamlı bir tedavi sunacak farmakolojik etkinliğe sahip olduğu gösterilen fakat çözünürlük problemi yaşayan, yeni bir ilaç adayı olan M3'ün karakterize ve formüle edilmesi için hedeflenen amaçlara ulaşılmıştır. NKT sayesinde çözünürlük ve çözünme hızı özellikleri ile ilişki olarak permeabilite özellikleri iyileştirilen M3'ün sahip olduğu farmakolojik etki yelpazesine ek olarak hasta uyuncunun artırılması ve suya erişimi kısıtlı olan hasta gruplarına da hitap etmesi açısından ADF formülasyonlarının geliştirilmesi, HT'da tedavi etkinliğinin artırılması açısından ümit vadetmektedir. Çalışmaların in-vivo çalışmalar ile desteklenmesi önerilmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Aydoğdu S, Güler K, Bayram F, Altun B, Derici Ü, Abacı A, ve ark. Türk hipertansiyon uzlaşı raporu, Ankara: Türk Kardiyoloji Derneği; 2019;47(6):535-46.
2. Williams B, Mancia G, Spiering W, Rosei EA, Azizi M, Burnier M, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Society of Hypertension (ESH). *J Hypertens.* 2018;39(33):3021-104.
3. Arıcı M, Birdane A, Güler K, Yıldız BO, Altun B, Ertürk Ş, ve ark. Türk hipertansiyon uzlaşı raporu, Ankara: Türk Kardiyoloji Derneği; 2015.43(4):402-9.
4. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği (TEMĐ). Hipertansiyon tanı ve tedavi kılavuzu, Ankara: Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği Obezite, Lipid Metabolizması ve Hipertansiyon Çalışma Grubu; 2018.
5. Kearney MP, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet.* 2005;365(9455):217-23.
6. Mills KT, Stefanescu A, He J. The global epidemiology of hypertension. *Nat Rev Nephrol.* 2020;16(4):223-37.
7. Giménez VMM, Kassuha D, Manucha W. Nanotechnology offers a promising therapeutic approach for hypertension treatment. *Hipertens Riesgo Vasc.* 2017;34(3):120-7.
8. Goldmann S, Stoltefuss J. 1,4-Dihydropyridines: Effects of chirality and conformation on the calcium antagonist and calcium agonist activities. *Angew Chem Int Ed.* 1991;30(12):1559-78.
9. Akıcı A, Akova M, Duman DK, Erdemli İ, Babaoğlu MÖ, Birincioğlu M, ve ark. Akılcı tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 13. Baskı. Ankara: Pelikan Yayınevi; 2012.
10. Albayrak E. Kondanse 1,4-dihidropiridin-3-karboksilat türevleri ve kalsiyum modölatör etkileri [Yüksek lisans tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2015.
11. Ashimori A, Ono T, Uchida T, Ohtaki Y, Fukaya C, Watanabe M, et al. Novel 1,4-dihydropyridine calcium antagonists. I. Synthesis and hypotensive activity of 4-(substituted pyridyl)-1,4-dihydropyridine derivatives. *Chem Pharm Bull.* 1990;38(9):2446-58.
12. Budriesi R, Bissi A, Ioan P, Rampa A, Gobbi S, Belluti F, et al. 1,4-dihydropyridine derivatives as calcium channel modulators: The role of 3-methoxy-flavone moiety. *Bioorg Med Chem.* 2005;13(10):3423-30.
13. Hantzsch A. Ueber die synthese pyridinartiger verbindungen aus acetessigäther und aldehydammoniak. *Justus Liebigs Ann Chem.* 1882;215(1):1-82.
14. Yamagishi S, Nakamura K. Revival of nifedipine, a dihydropyridine-based calcium blocker. *Med Hypotheses.* 2007;68(3):565-7.
15. Nyborg NCB, Mulvany MJ. Effect of felodipine, a new dihydropyridine vasodilator, on contractile responses to potassium, noradrenaline and calcium in mesenteric resistance vessels of the rat. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1984;6(3):499-505.

16. Freedman DD, Waters DD. Second generation dihydropyridine calcium antagonists-greater vascular selectivity and some unique applications. *Drugs*. 1987;34(5):578-98.
17. Zamponi GW, Striessnig J, Koschak A, Dolphin AC. The physiology, pathology, and pharmacology of voltage-gated calcium channels and their future therapeutic potential. *Pharmacol Rev*. 2015;67(4):821–70.
18. Bladen C, Gündüz MG, Şimşek R, Şafak C, Zamponi GM. Synthesis and evaluation of 1,4-dihydropyridine derivatives with calcium channel blocking activity. *Pflugers Arch Eur J Physiol*. 2014;466(7):1355–63.
19. Kumar PP, Stotz SC, Paramashivappa R, Beedle AM, Zamponi GW, Rao AS. Synthesis and evaluation of a new class of nifedipine analogs with T-type calcium channel blocking activity. *Mol Pharmacol*. 2002;61(3):649–58.
20. Yamamoto E, Kataoka K, Dong YF, Nakamura T, Fukuda M, Nako H, et al. Benidipine, a dihydropyridine L-type/T-type calcium channel blocker, affords additive benefits for prevention of cardiorenal injury in hypertensive rats. *J Hypertens*. 2010;28(6):1321–9.
21. Baranda AB, Alonso RM, Jiménez RM, Weinmann W. Instability of calcium channel antagonists during sample preparation for LC–MS–MS analysis of serum samples. *Forensic Sci Int*. 2006;156(1):23–34.
22. Mielcarek J. Photochemical stability of the inclusion complexes formed by modified 1,4-dihydropyridine derivatives with β -cyclodextrin. *J Pharm Biomed Anal*. 1997;15(6):681-6.
23. Norlander AE, Madhur MS, Harrison DG. The immunology of hypertension. *J Exp Med*. 2018;215(1):21–33.
24. Mancia G, Fagard R, Narkiewicz K, Redon J, Zanchetti A, Böhm M, et al. 2013 ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension: The task force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *J Hypertens*. 2013;31(7):1281-357.
25. Baggary SA, Kemp RJ, Wang X, Magoun AD. Factors associated with medication adherence and persistence of treatment for hypertension in a Medicaid population. *Res Social Adm Pharm*. 2014;10(6):e99-112.
26. Mohammad IS, Hu H, Yin L, He W. Drug nanocrystals: Fabrication methods and promising therapeutic applications. *Int J Pharm*. 2019;562:187–202.
27. Chawra HS, Tanwar YS, Gilhotra RM, Singh SK. Gastroretentive drug delivery systems a potential approach for antihypertensive drugs: An updated review. *Asian Pac J Health Sci*. 2018;5(2):217-23.
28. Sharma M, Sharma R, Jain DK. Nanotechnology based approaches for enhancing oral bioavailability of poorly water soluble antihypertensive drugs. *Scientifica*. 2016;2016:8525679.
29. Sastry SV, Nyshadham JR, Fix JA. Recent technological advances in oral drug delivery – a review. *Pharm Sci Technol Today*. 2000;3(4):138-45.

30. Alam T, Khan S, Gaba B, Haider F, Baboota S, Ali J. Nanocarriers as treatment modalities for hypertension. *Drug Deliv.* 2017;24(1):358–69.
31. Niaz T, Nasir H, Shabbir S, Rehman A, Imran M. Polyionic hybrid nano-engineered systems comprising alginate and chitosan for antihypertensive therapeutics. *Int J Biol Macromol.* 2016;91:180–7.
32. Khadka P, Ro J, Kim H, Kim I, Kim JT, Kim H, et al. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. *Asian Pharm Sci.* 2014;9(6):304-16.
33. Sanphui P, Devi VK, Clara D, Malviya N, Ganguly S, Desiraju GR. Cocrystals of hydrochlorothiazide: solubility and diffusion/ permeability enhancements through drug–coformer interactions. *Mol Pharm.* 2015;12(5):1615-22.
34. Beermann B, Groschinsky-Grind M. Pharmacokinetics of hydrochlorothiazide in man. *Eur J Clin Pharmacol.* 1977;12(4):297-303.
35. Gül IG, Eryılmaz G, Karamustafalıoğlu KO. P-glycoprotein and its role in treatment resistance. *Curr Approach Psychiatry.* 2016;8(1):19-31.
36. Kato Y, Miyazaki T, Kano T, Sugiura T, Kubo Y, Tsuji A. Involvement of influx and efflux transport systems in gastrointestinal absorption of celiprolol. *J Pharm Sci.* 2009;98(7):2529-39.
37. Riddell JG, Shanks RG, Brogden RN. Celiprolol a preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and its therapeutic use in hypertension and angina pectoris. *Drugs.* 1987;34(4):438-58.
38. Castaneda L. A Facile method for formulation of atenolol nanocrystal drug with enhanced bioavailability. Movahedi B, editor. *Nanocrystalline materials.* London: IntechOpen; 2019.
39. Vogelpoel H, Welink J, Amidon GL, Junginger HE, Midha KK, Möller H, et al. Biowaiver monographs for immediate release solid oral dosage forms based on Biopharmaceutics Classification System (BCS) literature data: verapamil hydrochloride, propranolol hydrochloride, and atenolol. *J Pharm Sci.* 2004;93(8):1945-56.
40. Li X, Hu J, Wang B, Sheng L, Liu Z, Yang S, et al. Inhibitory effects of herbal constituents on P-glycoprotein in vitro and in vivo: Herb–drug interactions mediated via P-gp. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2014;275(2):163-75.
41. Kirch W, Görg KG. Clinical pharmacokinetics of atenolol - A review. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 1982;7(2):81-91.
42. Selvam RP, Singh AK, Sivakumar T. Transdermal drug delivery systems for antihypertensive drugs - A review. *Int J Pharm Biomed Res.* 2010;1(1):1-8.
43. Bergström CAS, Andersson SBE, Fagerberg JH, Ragnarsson G, Lindahl A. Is the full potential of the biopharmaceutics classification system reached?. *Eur J Pharm Sci.* 2014;57:224-31.
44. Aqil M, Zafar S, Ali A, Ahmad S. Transdermal drug delivery of labetalol hydrochloride: System development, in vitro; ex vivo and in vivo characterization. *Curr Drug Deliv.* 2005;2(2):125-31.

45. Deferme S, Mols R, Driessche WV, Augustijns P. Apricot extract inhibits the P-gp-mediated efflux of talinolol. *J Pharm Sci.* 2002;91(12):2539-48.
46. Gurunath S, Nanjwade BK, Patil PA. Oral bioavailability and intestinal absorption of candesartan cilexetil: role of naringin as P-glycoprotein inhibitor. *Drug Dev Ind Pharm.* 2015;41(1):170-6.
47. Juan H, Terhaag B, Cong Z, Bi-Kui Z, Rong-Hua Z, Feng W, et al. Unexpected effect of concomitantly administered curcumin on the pharmacokinetics of talinsolol in healthy Chinese volunteers. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007;63(7):663-8.
48. Ghai D, Sinha VR. Nanoemulsions as self-emulsified drug delivery carriers for enhanced permeability of the poorly water-soluble selective β_1 adrenoreceptor blocker talinolol. *Nanomedicine.* 2012;8(5):618-26.
49. Mahmoud EA, Bendas ER, Mohamed MI. Preparation and evaluation of self-nanoemulsifying tablets of carvedilol. *AAPS PharmSciTech.* 2009;10(1):183-92.
50. Hamed R, Awadallah A, Sunoqrot S, Tarawneh O, Nazzal S, AlBaraghtli T, et al. pH-Dependent solubility and dissolution behavior of carvedilol—case example of a weakly basic bcs class II drug. *AAPS PharmSciTech.* 2016;17(2):418-26.
51. Planinsek O, Kovacic B, Vrečer F. Carvedilol dissolution improvement by preparation of solid dispersions with porous silica. *Int J Pharm.* 2011;406(1-2):41-8.
52. Lindenberg M, Kopp S, Dressman JB. Classification of orally administered drugs on the world health organization model list of essential medicines according to the biopharmaceutics classification system. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004;58(2):265-78.
53. Navia MA, Chaturvedi PR. Design principles for orally bioavailable drugs *Drug Discov.* 1996;1(5):179-89.
54. Kamiyama E, Nakai D, Mikkaichi T, Okudaira N, Okazaki O. Interaction of angiotensin II type 1 receptor blockers with P-gp substrates in Caco-2 cells and hMDR1-expressing membranes. *Life Sci.* 2010;86(1-2):52-8.
55. Beg S, Swain S, Singh HP, Patra CN, Rao MB. Development, optimization, and characterization of solid self-nanoemulsifying drug delivery systems of valsartan using porous carriers. *AAPS PharmSciTech.* 2012;13(4):1416-27.
56. Saydam M, Takka S. Bioavailability file: valsartan. *FABAD J Pharm Sci.* 2007;4(32):185-96.
57. Bajaj A, Rao MRP, Pardeshi A, Sali D. Nanocrystallization by evaporative antisolvent technique for solubility and bioavailability enhancement of telmisartan. *AAPS PharmSciTech.* 2012;13(4):1331-40.
58. Wiene W, Entzeroth M, Meel JCA, Stangier J, Busch U, Ebner T, et al. A review on telmisartan: a novel, long-acting angiotensin II-receptor antagonist. *Cardiovasc Drug Rev.* 2000;18(2):127-54.
59. Patel J, Kevin G, Patel A, Raval M, Sheth N. Design and development of a self nanoemulsifying drug delivery system for telmisartan for oral drug delivery. *Int J Pharm Investig.* 2011;1(2):112-9.
60. Chang C, Bahadduri PM, Polli JE, Swaan PW, Ekins S. Rapid identification of P-glycoprotein substrates and inhibitors. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(12):1976-84.

61. Brunner HR. The new oral angiotensin II antagonist olmesartan medoxomil: a concise overview. *J Hum Hypertens*. 2002;16(2):13-6.
62. Nooli M, Chella N, Kulhari H, Shastri NR, Sistla R. Solid lipid nanoparticles as vesicles for oral delivery of olmesartan medoxomil: formulation, optimization and in vivo evaluation. *Drug Dev Ind Pharm*. 2017;43(4):611-7.
63. Jain S, Reddy VA, Arora S, Patel K. Development of surface stabilized candesartan cilexetil nanocrystals with enhanced dissolution rate, permeation rate across CaCo-2, and oral bioavailability. *Drug Deliv Transl Res*. 2016;6(5):498-510.
64. Hoppe K, Sznitowska M. The effect of polysorbate 20 on solubility and stability of candesartan cilexetil in dissolution media. *AAPS PharmSciTech*. 2014;15(5):1116-25.
65. McClellan KJ, Goa KL. Candesartan cilexetil. *Drugs*. 1998;56(5):847-69.
66. Patel PJ, Gajera BY, Dave RH. A quality-by-design study to develop nifedipine nanosuspension: examining the relative impact of formulation variables, wet media milling process parameters and excipient variability on drug product quality attributes. *Drug Dev Ind Pharm*. 2018;44(12):1942-52.
67. Elliott WJ, Ram CVS. Calcium channel blockers. *J Clin Hypertens*. 2011;13(9):687-9.
68. Weerapol Y, Limmatvapirat S, Jansakul C, Takeuchi H, Sriamornsak P. Enhanced dissolution and oral bioavailability of nifedipine by spontaneous emulsifying powders: Effect of solid carriers and dietary state. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015;91:25-34.
69. Hecq J, Deleers M, Fanara D, Vranckx H, Amighi K. Preparation and characterization of nanocrystals for solubility and dissolution rate enhancement of nifedipine. *Int J Pharm*. 2005;299(1-2):167-77.
70. Chung M, Reitberg D, Gaffney M, Singleton W. Clinical pharmacokinetics of nifedipine gastrointestinal therapeutic system: A controlled-release formulation of nifedipine. *Am J Med*. 1987;83(6B):10-4.
71. Xia D, Quan P, Piao H, Piao H, Suna S, Yin Y, et al. Preparation of stable nitrendipine nanosuspensions using the precipitation-ultrasonication method for enhancement of dissolution and oral bioavailability. *Eur J Pharm Sci*. 2010;40(4):325-34.
72. Goa KL, Sorkin EM. Nitrendipine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in the treatment of hypertension. *Drugs*. 1987;33(2):123-55.
73. Rajnarayana K, Venkatesham A, Krishna DR. Influence of some bioflavonoids on the transport of nitrendipine. *Drug Metabol Drug Interact*. 2008;23(3):299-310.
74. Quan P, Xia D, Piao H, Piao H, Shi K, Jia Y, et al. Nitrendipine nanocrystals: Its preparation, characterization, and in vitro-in vivo evaluation. *AAPS PharmSciTech*. 2011;12(4):1136-43.

75. Piao YJ, Choi JS. Effects of morin on the pharmacokinetics of nicardipine after oral and intravenous administration of nicardipine in rats. *J Pharm Pharmacol.* 2008;60(5):625-9.
76. Krishnaiah YSR, Satyanarayana V, Karthikeyan RS. Effect of the solvent system on the in vitro permeability of nicardipine hydrochloride through excised rat epidermis. *J Pharm Pharm Sci.* 2002;5(2):124-30.
77. Kawashima A, Kasuya H, Sasahara A, Miyajima M, Izawa M, Hori T. Prevention of cerebral vasospasm by nicardipine prolonged-release implants in dogs. *Neurol Res.* 2016;22(6):634-41.
78. Subramanian S, Singreddy A, Krishnamoorthy K, Rajappan M. Nanosponges: a novel class of drug delivery system-review. *J Pharm Pharm Sci.* 2012;15(1):103-11.
79. Maghraby GM, Elsergany RN. Fast disintegrating tablets of nisoldipine for intraoral administration. *Pharm Dev Technol.* 2014;19(6):641-50.
80. Fu Q, Ma M, Li M, Wang G, Guo M, Jingru Li J, et al. Improvement of oral bioavailability for nisoldipine using nanocrystals. *Powder Technol.* 2017;305:757–63.
81. Prajapat MD, Patel NJ, Bariya A, Patel SS, Butani SB. Formulation and evaluation of self-emulsifying drug delivery system for nimodipine, a BCS class II drug. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2017;39:59-68.
82. Kale AA, Patravale VB. Design and evaluation of self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) of nimodipine. *AAPS PharmSciTech.* 2008;9(1):191-6.
83. Chalikwar SS, Belgamwar VS, Talele VR, Surana SJ, Patil MU. Formulation and evaluation of nimodipine-loaded solid lipid nanoparticles delivered via lymphatic transport system. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2012;97(1):109-16.
84. Ramasahayam B, Eedara RB, Kandadi P, Jukanti R, Bandari S. Development of isradipine loaded self-nano emulsifying powders for improved oral delivery: in vitro and in vivo evaluation. *Drug Dev Ind Pharm.* 2015;41(5):753-63.
85. Tirunagari M, Jangala VR, Khagga M, Gannu R. Transdermal therapeutic system of isradipine: Effect of hydrophilic and hydrophobic matrix on in vitro and ex vivo Characteristics. *Arch Pharm Res.* 2010;33(7):1025-33.
86. Jing B, Wang Z, Yang R, Zheng X, Zhao J, Tang S, et al. Enhanced oral bioavailability of felodipine by novel solid self microemulsifying tablets. *Drug Dev Ind Pharm.* 2016;42(3):506-12.
87. Sandeep MS, Sridhar V, Puneeth Y, Babu PR, Babu KN. Enhanced oral bioavailability of felodipine by naringenin in wistar rats and inhibition of Pglycoprotein in everted rat gut sacs in vitro. *Drug Dev Ind Pharm.* 2014;40(10):1371-7.
88. Basalious EB, El-Sebaie W, El-Gazayerly O. Application of pharmaceutical QbD for enhancement of the solubility and dissolution of a class II BCS drug using polymeric surfactants and crystallization inhibitors: Development of controlled-release tablets. *AAPS PharmSciTech.* 2011;12(3):799-810.

89. Kim KA, Park PW, Park JY. Effect of ABCB1 (MDR1) haplotypes derived from G2677T/C3435T on the pharmacokinetics of amlodipine in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol.* 2006;63(1):53-8.
90. Yeum CH, Choi JS. Effect of naringin pretreatment on bioavailability of verapamil in rabbits. *Arch Pharm Res.* 2006;29(1):102-7.
91. Choi JS, Li X. Enhanced diltiazem bioavailability after oral administration of diltiazem with quercetin to rabbits. *Int J Pharm.* 2005;297(1-2):1-8.
92. Davis SS, Illum L, Triccas IM, Winchcomb KM. The simultaneous degradation and sorption of diltiazem in aqueous solution. *Int J Pharm.* 1986;30(1):29-33.
93. McClellan GA, Sutton SC, Engle K, Zentner GM. The solubility-modulated osmotic pump: in vitro/in vivo release of diltiazem hydrochloride. *Pharm Res.* 1991;8(1):88-92.
94. World Health Organization (WHO), Protocol to conduct equilibrium solubility experiments for the purpose of biopharmaceutics classification system-based classification of active pharmaceutical ingredients for biowaiver [Internet]. 2018 [Erişim tarihi 4 Nisan 2020]. Erişim adresi: https://www.who.int/medicines/areas/quality_safaty/quality_assurance/03_07_18_qas_17_699_rev_2_protocol_equilibrium_solubility_experiments.pdf?ua=1.
95. Hörter D, Dressman JB. Influence of physicochemical properties on dissolution of drugs in the gastrointestinal tract. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;46(1-3):75–87.
96. Qionghua W. Nanocrystals & loaded porous silica for increased oral bioavailability [Doktora tezi]. China: Freie Universitat Berlin; 2016.
97. Jermain SV, Brough C, Williams RO. Amorphous solid dispersions and nanocrystal technologies for poorly water soluble drug delivery – An update. *Int J Pharm.* 2018;535(1-2):379-92.
98. Junyaprasert VB, Morakul B. Nanocrystals for enhancement of oral bioavailability of poorly - water-soluble drugs. *Asian J Pharm Sci.* 2015;10(1):13-23.
99. Gülsün T, Gürsoy RN, Öner L. Nanocrystal technology for oral delivery of poorly water-soluble drugs. *FABAD J Pharm Sci.* 2009;34(1):55-65.
100. Shegokar R, Müller RH. Nanocrystals: Industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives. *Int J Pharm.* 2010;399(1-2):129–39.
101. Sinha B, Müller RH, Möschwitzer JP. Bottom-up approaches for preparing drugnanocrystals: Formulations and factors affecting particle size. *Int J Pharm.* 2013;453(1):126-41.
102. Ferčej-Temeljotov D, Kmet M, Kocjan D, Kontik S, Resman A, Urleb U, et al. Stereoselectivity in β -cyclodextrin complexation of 1, 4-dihydropyridine derivatives. *Chirality.* 1993;5(4):288-292.
103. Dahiya S. Drug nanonization: an overview of industrially feasible top-down technologies for nanocrystal production. *Bull Pharm Res.* 2017;7(2):144-52.

104. Singh A, Worku ZA, Van den Mooter G. Oral formulation strategies to improve solubility of poorly water-soluble drugs. *Expert Opin Drug Deliv*. 2011;8(10):1361-78.
105. Savjani KT, Gajjar AK, Savjani JK. Drug solubility: Importance and enhancement techniques. *International Scholarly Research Notices*. 2012;1-10.
106. Wagh H, Salunkhe KS, Chavan MJ, Hundiwale JC, Asti A, Pere U. A review on techniques to improve solubility of poorly soluble drugs. *World J Pharm Pharm Sci*. 2018;7(7):254-67.
107. Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. A Theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: The correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res*. 1995;12(3):413-20.
108. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (EMA), Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), Guideline on the investigation of bioequivalence [Internet]. 2010 [Erişim tarihi 4 Nisan 2020]. Erişim adresi: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-bioequivalence-rev1_en.pdf.
109. European Medicines Agency (EMA). ICH M9 on biopharmaceutics classification system-based biowaivers. [Internet]. 2020 [Erişim tarihi 4 Haziran 2022]. Erişim adresi: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-m9-biopharmaceutics-classification-system-based-biowaivers-step-5_en.pdf.
110. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (FDA), Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for industry: waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system. [Internet]. 2017 [Erişim tarihi 4 Nisan 2020]. Erişim adresi: <https://collections.nlm.nih.gov/catalog/nlm:nlmuid-101720038-pdf>.
111. World Health Organization (WHO), Proposal to waive in vivo bioequivalence requirements for WHO model list of essential medicines immediate release, solid oral dosage forms. [Internet]. 2006 [Erişim tarihi 4 Nisan 2020]. Erişim adresi: https://www.gmp-compliance.org/files/guidemgr/WHO_TRS_937_annex8.pdf.
112. Davit BM, Kanfer I, Tsang YC, Cardot JM. BCS biowaivers: similarities and differences among EMA, FDA, and WHO requirements. *AAPS J*. 2016;18(3):612-8.
113. Yaşın DS, Teksin ZŞ. Biopharmaceutics classification system: Evaluation on international guidelines and countries. *J Lit Pharm Sci*. 2018;7(2):160-74.
114. Noyes AA, Whitney WR. The rate of solution of solid substances in their own solutions. *J Am Chem Soc*. 1897;19(12):930-4.
115. Dokoumetzidis A, Macheras P. A century of dissolution research: from noyes and whitney to the biopharmaceutics classification system. *Int J Pharm*. 2006;321(1-2):1-11.
116. Zisaki A, Miskovic L, Hatzimanikatis V. Antihypertensive drugs metabolism: An update to pharmacokinetic profiles and computational approaches. *Curr Pharm Des*. 2015;21(6):806-22.

117. Marzo A, Bo LD, Mazzucchelli P, Monti NC, Crivelli F, Ismaili S, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparative study of zofenopril and enalapril in healthy volunteers. *Arzneimittelforschung*. 2002;52(4):233–42.
118. Sighvi SM, Duchin KL, Morrison RA, Willard DA, Everett DW, Frantz M. Disposition of fosinopril sodium in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol*. 1988;25(1):9-15.
119. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*. 1997;23(1-3):3-25.
120. Ausburger LL, Dressman JB, Hickey AJ, Hussian A, Polli JW, Brittain HG, et al. *Pharmaceutical preformulation and formulation*. 2nd ed. New York: USA:2009.
121. Shringirishi M, Mahor A, Gupta R, Prajapati SK, Bansal K, Kesharwani P. Fabrication and characterization of nifedipine loaded β -cyclodextrin nanosponges: An in vitro and in vivo evaluation. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2017;41:344-50.
122. Chalamalasetty AK, Boggula N, Bolledla N, Bakshi V, Peddapalli H. Design, development and characterization of nifedipine microspheres. *J Drug Deliv Ther*. 2019;9(3):138-46.
123. Waller DG, Renwick AG, Gruchy BS, George CF. The first pass metabolism of nifedipine in man. *Br J Clin Pharmacol*. 1984;18(6):951-4.
124. Florence AT. Nanoparticle uptake by the oral route: Fulfilling its potential?. *Drug Discov Today Technol*. 2005;2(1):75-81.
125. Hunter AC, Elsomb J, Wibroe PP, Moghimic SM. Polymeric particulate technologies for oral drug delivery and targeting: A pathophysiological perspective. *Maturitas*. 2012;73(2012):5-18.
126. Juliano RL, Ling V. A Surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta*. 1976;455(1):152-62.
127. Constantinides PP, Wasan KM. Lipid Formulation strategies for enhancing intestinal transport and absorption of P-glycoprotein (P-gp) substrate drugs: in vitro/in vivo case studies. *J Pharm Sci*. 2007;96(2):235-48.
128. Lopes CM, Bettencourt C, Rossi A, Buttini F, Barata P. Overview on gastroretentive drug delivery systems for improving drug bioavailability. *Int J Pharm*. 2016;510(1):144–58.
129. Porwal A, Dwivedi H, Pathak K. Decades of research in drug targeting using gastroretentive drug delivery systems for antihypertensive therapy. *Braz J Pharm. Sci*. 2017;53(3):1-15.
130. Ensign LM, Cone R, Hanes J. Oral drug delivery with polymeric nanoparticles: The gastrointestinal mucus barriers. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(6):557–70.
131. Yun Y, Cho YW, Park K. Nanoparticles for oral delivery: Targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2013;65(6):822–32.
132. Venishetty VK, Chede R, Komuravelli R, Adepua L, Sistla R, Diwana PV. Design and evaluation of polymer coated carvedilol loaded solid lipid nanoparticles to

improve the oral bioavailability: A novel strategy to avoid intraduodenal administration. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2012;95:1-9.

133. Kumar VV, Chandrasekar D, Ramakrishna S, Kishan V, Rao YM, Diwan PV. Development and evaluation of nitrendipine loaded solid lipid nanoparticles: Influence of wax and glyceride lipids on plasma pharmacokinetics. *Int J Pharm*. 2007;335(1-2):167-75.
134. Okur NÜ, Yurdasiper A, Gündoğdu E, Gökçe EH. Modification of solid lipid nanoparticles loaded with nebivolol hydrochloride for improvement of oral bioavailability in treatment of hypertension: polyethylene glycol versus chitosan oligosaccharide lactate. *J Microencapsul*. 2016;33(1):30-42.
135. Soma D, Attari Z, Reddy MS, Damodaram A, Koteshwara KBG. Solid lipid nanoparticles of irbesartan: preparation, characterization, optimization and pharmacokinetic studies. *Braz J Pharm Sci*. 2017;53(1):1-10.
136. Pandya NT, Jani P, Vanza J, Tandel H. Solid lipid nanoparticles as an efficient drug delivery system of olmesartan medoxomil for the treatment of hypertension. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2018;165:37-44.
137. Ertürk AS, Gürbüz MU, Metin Tülü M. The effect of PAMAM dendrimer concentration, generation size and surface functional group on the aqueous solubility of candesartan cilexetil. *Pharm Dev Technol*. 2017;22(1):111-21.
138. Gautam SP, Verma A. PAMAM dendrimers: novel polymeric nanoarchitectures for solubility enhancement of candesartan cilexetil. *Pharm Sci*. 2012;1:1-4.
139. D'Emanuele A, Jevprasesphant R, Penny J, Attwood D. The use of a dendrimer-propranolol prodrug to bypass efflux transporters and enhance oral bioavailability. *J Control Release*. 2004;95(3):447-53.
140. Singh MK, Pooja D, Kulhari H, Jain SK, Sistla R, Chauhan AS. Poly (amidoamine) dendrimer-mediated hybrid formulation for combination therapy of ramipril and hydrochlorothiazide. *Eur J Pharm Sci*. 2017;96:84-92.
141. Yang YH, Ding PT. Study on the preparation of nifedipine-loaded oral copolymer micelles and its pharmacokinetics in rats. *Cell Biochem Biophys*. 2015;71(1):155-60.
142. Ge H, Hu Y, Jiang X, Cheng D, Yuan Y, Bi H, et al. Preparation, characterization, and drug release behaviors of drug nimodipine-loaded poly(ϵ -caprolactone)-poly(ethylene oxide)-poly(ϵ -caprolactone) amphiphilic triblock copolymer micelles. *J Pharm Sci*. 2002;91(6):1463-73.
143. Fares AR, ElMeshad AN, Kassem MAA. Enhancement of dissolution and oral bioavailability of lacidipine via pluronic P123/ F127 mixed polymeric micelles: formulation, optimization using central composite design and in vivo bioavailability study. *Drug Deliv*. 2018;25(1):132-42.
144. El-Gendy MA, El-Assal MIA, Tadros MI, El-Gazayerly ON. Olmesartan medoxomil-loaded mixed micelles: Preparation, characterization and in-vitro evaluation. *Future J Pharm Sci*. 2017;3(2):90-4.
145. Möschwitzer JP. Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process. *Int J Pharm*. 2013;453(1):142-56.

146. Chang TL, Zhan H, Liang D, Liang JF. Nanocrystal technology for drug formulation and delivery. *Front Chem Sci Eng*. 2015;9(1):1–14.
147. Thanki K, Gangwal RP, Sangamwar AT, Jain S. Oral delivery of anticancer drugs: Challenges and opportunities. *J Control Release*. 2013;170(1):15–40.
148. Müller RH, Peters K. Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs: I. Preparation by a size-reduction technique. *Int J Pharm*. 1998;160(2):229–37.
149. Kipp JE. The role of solid nanoparticle technology in the parenteral delivery of poorly water-soluble drugs. *Int J Pharm*. 2004;284(1-2):109–22.
150. Gao L, Liu G, Ma J, Wang X, Zhou L, Li X. Drug nanocrystals: In vivo performances. *J Control Release*. 2012;160(3):418–30.
151. Keck CM, Müller RH. Drug nanocrystals of poorly soluble drugs produced by high pressure homogenisation. *Eur J Pharm Biopharm*. 2006;62(1):3–16.
152. Müller RH, Olbrich C. Medicament vehicle for the controlled administration of an active agent, produced from lipid matrix-medicament conjugates, Patent No: WO2000067800A2. Germany; 2000.
153. Pawar VK, Singh Y, Meher JG, Gupta S, Chourasia MK. Engineered nanocrystal technology: In-vivo fate, targeting and applications in drug delivery. *J Control Release*. 2014;183:51–66.
154. Müller RH, Jacobs C, Kayser O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy rationale for development and what we can expect for the future. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;47(1):3–19.
155. Müller RH, Keck CM. Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs – a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles. *J Biotechnol*. 2004;113(1-3):151–70.
156. Gao L, Liu G, Ma J, Wang X, Wang F, Wang H, et al. Paclitaxel nanosuspension coated with P-gp inhibitory surfactants: II. Ability to reverse the drug-resistance of H460 human lung cancer cells. *Colloids Surf B: Biointerfaces*. 2014;117:122–7.
157. Rege BD, Kao JPY, Polli JE. Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharm Sci*. 2002;16(4-5):237–46.
158. Guo Y, Luo J, Tan S, Otieno BO, Zhang Z. The applications of vitamin E TPGS in drug delivery. *Eur J Pharm Sci*. 2013;49(2):175–86.
159. Fan M, Geng S, Liu Y, Wang J, Wang Y, Zhong J, et al. Nanocrystal technology as a strategy to improve drug bioavailability and antitumor efficacy for the cancer treatment. *Curr Pharm Des*. 2018;24(21):2416–24.
160. Collnot EM, Baldes C, Wempe MF, Hyatt J, Navarro L, Edgar KJ, et al. Influence of vitamin E TPGS poly(ethylene glycol) chain length on apical efflux transporters in Caco-2 cell monolayers. *J Control Release*. 2006;111(1-2):35–40.
161. Malamataris M, Taylor KMG, Malamataris S, Douroumis D, Kachrimanis K. Pharmaceutical nanocrystals: production by wet milling and applications. *Drug Discov Today*. 2018;23(3):534–47.

162. Shete G, Jaina H, Punja D, Prajapata H, Akotiyaa P, Bansala AK. Stabilizers used in nano-crystal based drug delivery systems. *J Excipients and Food Chem.* 2014;5(4):184-209.
163. Van Eerdenbrugh B, Vermant J, Martens JA, Froyen L, Van Humbeeck J, Augustijns P, et al. A screening study of surface stabilization during the production of drug nanocrystals. *J Pharm Sci.* 2008;98(6):2091-103.
164. Ghosh I, Schenck D, Bose S, Liu F, Mo M. Identification of critical process parameters and its interplay with nanosuspension formulation prepared by top down media milling technology – A QbD perspective. *Pharm Dev Technol.* 2013;18(3):719-29.
165. George M, Ghosh I. Identifying the correlation between drug/stabilizer properties and critical quality attributes (CQAs) of nanosuspension formulation prepared by wet media milling technology. *Eur J Pharm Sci.* 2013;48(1-2):142-52.
166. Peltonen L, Hirvonen J. Pharmaceutical nanocrystals by nanomilling: critical process parameters, particle fracturing and stabilization methods. *J Pharm Pharmacol.* 2010;62(11):1569-79.
167. Meruva S, Thool P, Shah S, Karki S, Bowen W, Ghosh I, et al. Formulation and performance of irbesartan nanocrystalline suspension and granulated or bead-layered dried powders – Part I. *Int J Pharm.* 2019a;568:118189.
168. Kabaş HD. Rivaroksaban nanokristallerinin hazırlanması ve in vitro-in vivo değerlendirilmesi [Doktora tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2018.
169. Lee J, Lee SJ, Choi JY, Yoo JY, Ahn CH. Amphiphilic amino acid copolymers as stabilizers for the preparation of nanocrystal dispersion. *Eur J Pharm Sci.* 2005;24(5):441-9.
170. Merisko-Liversidge E, Liversidge GG. Nanosizing for oral and parenteral drug delivery: A perspective on formulating poorly-water soluble compounds using wet media milling technology. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(6):427-40.
171. Dolenc A, Kristl J, Baumgartner S, Planinsek O. Advantages of celecoxib nanosuspension formulation and transformation into tablets. *Int J Pharm.* 2009;376(1-2):204-12.
172. Bilgili E, Afolabi A. A combined microhydrodynamics–polymer adsorption analysis for elucidation of the roles of stabilizers in wet stirred media milling. *Int J Pharm.* 2012; 439(1-2):193-206.
173. Hou Y, Shao J, Fu Q, Li J, Sun J, He Z. Spray-dried nanocrystals for a highly hydrophobic drug: Increased drug loading, enhanced redispersity, and improved oral bioavailability. *Int J Pharm.* 2017;516(1-2):372–9.
174. Kassem MAA, ElMeshad AN, Fares AR. Enhanced solubility and dissolution rate of lacidipine nanosuspension: Formulation via antisolvent sonoprecipitation technique and optimization using Box–Behnken Design. *AAPS PharmSciTech.* 2017;18(4):983-96.
175. Fu Q, Suna J, Zhang D, Li M, Wang Y, Ling G, et al. Nimodipine nanocrystals for oral bioavailability improvement: Preparation, characterization and pharmacokinetic studies. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2013;109(1):161– 6.

176. Li J, Fu Q, Liu X, Li M, Wang Y. Formulation of nimodipine nanocrystals for oral administration. *Arch Pharm Res.* 2016;39(2):202–12.
177. Huang S, Zhang Q, Li H, Sun Y, Cheng G, Zou M, et al. Increased bioavailability of efonidipine hydrochloride nanosuspensions by the wet-milling method. *Eur J Pharm Biopharm.* 2018;130:108–14.
178. Pınar SG. Siklosporinin yeni oral nanoformülasyonunun geliştirilmesi ve in vitro-in vivo değerlendirilmesi [Doktora tezi]. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2020.
179. Vehringa R, Fossb WR, Ballesterosb DL. Particle formation in spray drying. *J Aerosol Sci.* 2007;38(7):728-46.
180. Chaubal MV, Popescu C. Conversion of nanosuspensions into dry powders by spray drying: A case study. *Pharm Res.* 2008;25(10):2302-8.
181. Wang Y, Zhengb Y, Zhang L, Wang Q, Zhang D. Stability of nanosuspensions in drug delivery. *J Control Release.* 2013;172(3):1126–41.
182. Meruva S, Thoolb P, Karkib S, Bowenb W, Ghoshb I, Kumarb S. Downstream processing of irbesartan nanocrystalline suspension and minitabket development – Part II. *Int J Pharm.* 2019b;568:118509.
183. Martin L, Heinz S. Pharmaceutical colloidal hydrosols for injection, U.K. Patent No: 2200048. Switzerland;1998.
184. Junghanns JAH, Müller RH. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomedicine.* 2008;3(3):295–309.
185. Bansal S, Bansal M, Kumria R. Nanocrystals: Current strategies and trends. *Int J Res Pharm Biomed Sci.* 2012;3(1):406-19.
186. Wang L, Du J, Zhou Y, Wang Y. Safety of nanosuspensions in drug delivery. *Nanomedicine.* 2017;13(2):455-69.
187. Peltonen L, Hirvonen J. Drug nanocrystals – Versatile option for formulation of poorly soluble materials. *Int J Pharm.* 2018;537(1-2):73-83.
188. Stepanov V, Krasnoperov LN, Elkina IB, Zhang X. Production of nanocrystalline RDX by rapid expansion of supercritical solutions. *Propellants Explos Pyrotech.* 2005;30(3):178-83.
189. Jaspreet K, Sandeep K. Development of nanocrystal formulation with improved dissolution. *J Drug Deliv Ther.* 2018;8(5):128-9.
190. Bean BP. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol.* 1989;51:364-84.
191. Zamponi GW. Antagonist binding sites of voltage-dependent calcium channels. *Drug Dev Res.* 1997;42(3-4):131-43.
192. Bourinet E, Soong TW, Sutton K, Slaymaker S, Mathews E, Monteil A, et al. Splicing of alpha 1A subunit gene generates phenotypic variants of P- and Q-type calcium channels. *Nat Neurosci.* 1999;2(5):407-15.
193. Canbolat Ş, Atalık KEN. Kalsiyum Kanal Blokerlerinin Pleiotropik Etkileri. *Kafkas J Med Sci.* 2019;9(2):125-31.

194. Coca A, Mazon P, Aranda P, Redón J, Divisón JA, Martínez J, et al. Role of dihydropyridinic calcium channel blockers in the management of hypertension. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2013;11(1):91–105.
195. Kuthan J, Kurfurst A. Development in dihydropyridine chemistry. *Ind Eng Chem Product Res Dev.* 1982;21(2):191-261.
196. Saygın M, Nazıroğlu M, Çalışkan S. Recent developments on patch-clamp technique in electrophysiological studies. *J Exp Clin Med.* 2010;26(4):148-52.
197. Ayorinde JO, Odeniyi MA, Balogun-Agbaje O. Formulation and evaluation of oral dissolving films of amlodipine besylate using blends of starches with hydroxypropyl methyl cellulose. *Polim Med.* 2016;46(1):45-51.
198. Pezik E, Gülsün T, Gündüz MG, Sahin S, Vural I. Development and characterization of pullulan-based orally disintegrating films containing amlodipine besylate. *Eur J Pharm Sci.* 2021;156:105597.
199. European Medicines Agency (EMA), Guideline on the investigation of bioequivalence [Internet]. 2010 [Erişim tarihi 6 Nisan 2020]. Erişim adresi: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-bioequivalence-rev1_en.pdf.
200. Cilurzo F, Musazzi UM, Franze S, Selmin F, Minghetti P. Orodispersible dosage forms: biopharmaceutical improvements and regulatory requirements. *Drug Discov Today.* 2018;23(2):251-9.
201. European Pharmacopeia Commission, Oromucosal Preparations, European Pharmacopeia. European Directorate for the Quality of Medicine & Healthcare (EDQM), Strasbourg, France; 2016.
202. United States Pharmacopeia and National Formulary USP 42-NF 37, United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD; 2019.
203. Gupta MS, Kumar TP, Gowda DV, Rosenholm JM. Orodispersible films: Conception to quality by design. *Adv Drug Deliv Rev.* 2021;178:113983.
204. Lee Y, Kim K, Kim M, Choi DH, Jeong, SH. Orally disintegrating films focusing on formulation, manufacturing process, and characterization. *Int J Pharm Investig.* 2017;47(3):183-201.
205. Hoffmann EM, Breitenbach A, Breitzkreutz J. Advances in orodispersible films for drug delivery. *Expert Opin Drug Deliv.* 2011;8(3):299-316.
206. Gupta MS, Kumar TP, Gowda DV. Orodispersible Thin Film: A new patient-centered innovation. *J Drug Deliv Sci Tech.* 2020;59:101843.
207. Şahin G. Fosinopril sodyum içeren ağızda hızla dağılan dozaj formlarının geliştirilmesi ve karakterizasyonları [Yüksek lisans tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2016.
208. Bülbül EÖ. Oral film formülasyonlarının geliştirilmesi ve optimizasyonu [Doktora tezi]. İstanbul: İstanbul Üniversitesi; 2018.
209. Gökay Y. Verapamil hidroklorür içeren oral yoldan dağılan filmlerin hazırlanması ve değerlendirilmesi [Yüksek lisans tezi]. İstanbul: Marmara Üniversitesi; 2020.

210. Patil P, Shrivastava SK. Fast dissolving oral films: An innovative drug delivery system. *Int J Sci Res.* 2014;3(7):2088–93.
211. Akman R. İyon değiştirici kompleks içeren oral strip dozaj formları üzerinde yapılan çalışmalar [Yüksek Lisans tezi]. Ankara: Ankara Üniversitesi; 2019.
212. Dixit RP, Puthli SP. Oral strip technology: overview and future potential. *J Control Release.* 2009;139(2):94-107.
213. Mahboob MBH, Riaz T, Jamshaid M, Bashir I, Zulfiqar S. Oral films: A comprehensive review. *Int Curr Pharm.* 2016;5(12): 111-7.
214. Borges AF, Silva S, Coelho JFJ, Simões S. Oral films: Current status and future perspectives: I - Galenical development and quality attributes. *J Control Release.* 2015;28(206):1-19.
215. Pullulan GRAS Notification. [Internet]. 2018 [Erişim tarihi 4 Nisan 2022]. Erişim adresi: <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/PullulanPetition18131.pdf>
216. Stankovic, I. Pullulan. Chemical and Technical Assessment 65th JECFA. [Internet]. [Erişim tarihi 4 Nisan 2022]. Erişim adresi: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/agns/pdf/jecfa/cta/65/pullulan.pdf>.
217. Deepak K, Nisha S, Vinay P, Sajid A. An insight to pullulan: A biopolymer in pharmaceutical approaches. *Int J Basic App Sci.* 2012;1(3):202–19.
218. Scott R, Cade D, He X. Pullulan film compositions, United States Patent No: US 72677118 B2. New York;2007.
219. Pathare YS, Hastak VS, Bajaj AN. Polymers used for fast disintegrating oral films: A Review. *Int J Pharm Sci. Rev. Res.* 2013;21(1):169-78.
220. Saini S, Samta AC, Rana GS, Gupta S. Optimization of formulation of fast dissolving films made of pullulan polymer. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2011;9(1):127-31.
221. Türkmen Ö, Şenyiğit ZA, Baloğlu E. Formulation and evaluation of fexofenadine hydrochloride orally disintegrating tablets for pediatric use. *J Drug Deliv Sci Tech.* 2018;43:201–10.
222. Food and Drug Administration (FDA), Dissolution methods database [Internet]. [Erişim tarihi 12 Haziran 2022]. Erişim adresi: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/dissolution/dsp_SearchResults.cfm.
223. Klinkenberg R, Streekl B, Ceccato A. Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of amlodipine residues on manufacturing equipment surfaces. *J Pharm Biomed.* 2003;32(2):345-52.
224. Soons PA, Schellens JHM, Roosemalen MCM, Breimer DD. Analysis of nifedipine and its pyridine metabolite dehydronifedipine in blood and plasma: review and improved high-performance liquid chromatographic methodology. *J Pharm Biomed.* 1991;9(6):475-84.
225. Zendelovska D, Simeska S, Sibinovska O, Kostova E, Miloševska K, Jakovski K, et al. Development of an HPLC method for the determination of nifedipine in human plasma by solid-phase extraction. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2006;839(1-2):85-8.

226. International Council for Harmonisation (ICH), International conference on harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use: Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1). [Internet]. 2015 [Erişim tarihi 4 Nisan 2020]. Erişim adresi: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>.
227. World Health Organization (WHO), Guidelines on validation – Appendix 4 analytical method validation. Internet]. 2018 [Erişim tarihi 4 Nisan 2020]. Erişim adresi: https://www.dcvmn.org/IMG/pdf/who_guideline_validation_analyticalmethod_validationqas16-671.pdf.
228. Visser JC, Weggemans OAF, Boosman RJ, Loos KU, Frijlink HW, Woerdenbag HJ. Increased drug load and polymer compatibility of bilayered orodispersible films. *Eur J Pharm Sci.* 2017;107:183-90.
229. Bala R, Pawar P, Khanna S, Arora S. Orally dissolving strips: A new approach to oral drug delivery system. *Int J Pharm Investig.* 2013;3(2):67.
230. Singh S, Jain S, Muthu MS, Tiwari S, Tilak R. Preparation and evaluation of buccal bioadhesive films containing clotrimazole. *AAPS PharmSciTech.* 2008;9(2):660-7.
231. Singh S, Soni R, Rawat MK, Jain A, Deshpande SB, Singh SK. In vitro and in vivo evaluation of buccal bioadhesive films containing salbutamol sulphate. *Chem Pharm Bull.* 2010;58(3):307-11.
232. Na DH, Faraj J, Capan Y, Leung KP, DeLuca PP. Chewing gum of antimicrobial decapeptide (KSL) as a sustained antiplaque agent: preformulation study. *J Control Release.* 2005;107(1):122-30.
233. Sharma R, Kamboj S, Singh G, Rana V. Development of aprepitant loaded orally disintegrating films for enhanced pharmacokinetic performance. *Eur J Pharm Sci.* 2016b;84:55-69.
234. Shah P, Jogani V, Bagchi T, Misra A. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. *Biotechnol Prog.* 2006;22(1):186-98.
235. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom.* 2015;20(2):107-26.
236. Jose NM, Bunt CR, McDowell A, Chiu JZS, Hussain MA. A study of lactobacillus isolates' adherence to and influence on membrane integrity of human Caco-2 cells. *J Dairy Sci.* 2017;100(10):7891-6.
237. Uluhan ÖD. Ağızda dağılan tablet formülasyonlarının in vitro karakterizasyonları ve permeabiliteleri üzerine farklı yardımcı maddelerin ve basım tekniklerinin etkisi [Yüksek lisans tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2019.
238. van Breemen RB, Li Y. Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2005;1(2):175-85.
239. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Waiver of in vivo bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System guidance for industry [Internet]. 2017

[Erişim tarihi 4 Nisan 2022]. Erişim adresi: <https://collections.nlm.nih.gov/master/borndig/101720038/UCM070246.pdf>.

240. Volpe DA, Faustino PJ, Ciavarella AB, Asafu-Adjaye EB, Ellison CD, Yu LX, et al. Classification of drug permeability with a Caco-2 cell monolayer assay. *Clin Res Regul Aff.* 2007;24(1):39-47.
241. Sirisha K, Achaiah G, Reddy VM. Facile synthesis and antibacterial, antitubercular, and anticancer activities of novel 1,4-Dihydropyridines. *Archiv Pharm (Weinheim).* 2010;343(6):342-52.
242. Martin M, Follmann M, Vakalopoulos A, Zimmermann K, Teusch N, Engel K. Annulated 4-(indazolyl)- 1,4-dihydropyridinederivatives and methods of use thereof, Patent No: US20110172221A1. Germany; 2011.
243. Zhang YL, Li YF, Wang JW, Yu B, Shi YK, Liu HM. Multicomponent assembly of novel antiproliferative steroidal dihydropyridinyl spirooxindoles. *Steroids.* 2016;109:22–8.
244. Ateş M. Barsaklardan paraselüler ilaç absorpsiyonu üzerine permeabilite artırıcı ajanların etkisinin araştırılması [Yüksek lisans tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2013.
245. DrugBank [Internet]. [Erişim tarihi 12 Haziran 2022]. Erişim adresi: <https://go.drugbank.com/>
246. Orange Book: Approved drug products with therapeutic equivalence evaluations [Internet]. [Erişim tarihi 12 Haziran 2022]. Erişim adresi: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/ob/index.cfm>.
247. Shaikh LB, Pande VV, Musmade DS, Patil PP. Development and validation of RP-HPLC method for estimation of process related impurity in nimodipine bulk and formulation. *Der Pharmacia Lettre.* 2015;7(3):287-90.
248. Abou-Auda HS, Najjar TA, Al-Khamis KI, Al-Hadiya BM, Ghilzai NM, Al-Fawzan NF. Liquid chromatographic assay of nifedipine in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. *J Pharm Biomed Anal.* 2000;22(2):241-9.
249. Dwivedi S, Panigrahi D. Development and validation of a RP-HPLC method for estimation of nitrendipine in tablet dosage form. *Int J Pharm Teach Pract.* 2011;2(3): 117-9.
250. Hu L, Hu Q, Gao BPR. A validated, stability-indicating HPLC method for the determination of felodipine and its related substances. *Int J Pharm Sci.* 2013;4(9):3369-74.
251. Tipe DN, Vavia PR. Acrylate-based transdermal therapeutic system of nitrendipine. *Drug Dev Ind Pharm.* 2003;29(1):71-8.
252. Yadav SA, Rathore DS. Formulation, development and evaluation of novel nanoemulsion for transdermal drug delivery of nimodipine. *World J Pharm Res.* 2016;5(2):969-95.
253. Van Eerdenbrugh B, Alonzo DE, Taylor LS. Influence of particle size on the ultraviolet spectrum of particulate-containing solutions: implications for in-situ

concentration monitoring using UV/Vis fiber optic probes. *Pharm research*. 2011;28(7):1643-52.

254. Chhabra G, Chuttani K, Mishra AK, Pathak K. Design and development of nanoemulsion drug delivery system of amlodipine besilate for improvement of oral bioavailability. *Drug Dev Ind Pharm*. 2011;37(8):907-16.
255. Zu HY, Li N, Zhao X, Li Y, Ge Y, Wang W, et al. In vitro dissolution enhancement of micronized l-nimodipine by antisolvent re crystallization from its crystal form. *Int J Pharm*. 2014;464(1-2):1-9.
256. Xiong R, Lu W, Li J, Wang P, Xu R, Chen T. Preparation and characterization of intravenously injectable nimodipine nanosuspension. *Int J Pharm*. 2008;350(1-2):338-43.
257. Sahu BP, Das MK. Preparation and in vitro/in vivo evaluation of felodipine nanosuspension. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2014;39(3):183-93.
258. Rahman N, Azmi SNH. New spectrophotometric methods for the determination of nifedipine in pharmaceutical formulations. *Acta Biochim Pol*. 2005;52(4):915-22.
259. Mohammad MAA, Mahrouse MA, Amer AH, Elharati NS. Validated LC-MS/MS method for the simultaneous determination of enalapril maleate, nitrendipine, hydrochlorothiazide, and their major metabolites in human plasma. *Biomed Chromatogr*. 2020;34(12):e4955.
260. Wang Z, Sun J, Wang Y, Liu X, Liu Y, Fu Q, et al. Solid self-emulsifying nitrendipine pellets: Preparation and in vitro/in vivo evaluation. *Int J Pharm*. 2010;383(1-2):1-6.
261. Gülsün T, Borna SE, Vural I, Sahin S. Preparation and characterization of furosemide nanosuspensions. *J Drug Deliv Sci Technol*. 2018;45:93-100.
262. Takeuchi Y, Usui R, Ikezaki H, Tahara K, Takeuchi H. An advanced technique using an electronic taste-sensing system to evaluate the bitterness of orally disintegrating films and the evaluation of model films. *Int J Pharm*. 2017;531(1):179-90.
263. Foo WC, Khong YM, Gokhale R, Chan SY. A novel unit-dose approach for the pharmaceutical compounding of an orodispersible film. *Int J Pharm*. 2018;539(1-2):165-74.
264. Lakshmi PK, Sreekanth J, Sridharan A. Formulation development of fast releasing oral thin films of levocetizine dihydrochloride with Eudragit® Epo and optimization through Taguchi orthogonal experimental design. *Asian J Pharm*. 2011;5(2):84-92.
265. Panchal MS, Patel H, Bagada A, Vadalía KR. Formulation and evaluation of mouth dissolving film of ropinirole hydrochloride by using pullulan polymers. *Int J Pharm*. 2012;1(3):60-72.
266. Dinge A, Nagarsenker M. Formulation and evaluation of fast dissolving films for delivery of triclosan to the oral cavity. *AAPS PharmSciTech*. 2008;9(2):349-56.
267. Gorle A, Patil G. Design, development and evaluation of fast dissolving film of amlodipine besylate. *Int J Chem Tech Res*. 2017;10(4):334-44.

268. Kumar GP, Phani AR, Prasad RGSV, Sanganal JS, Manali N, Gupta R, et al. Polyvinylpyrrolidone oral films of enrofloxacin: film characterization and drug release. *Int J Pharm.* 2014;471(1-2):146-52.
269. Sharma D, Kaur D, Verma S, Singh D, Singh M, Garg R. Fast dissolving oral films technology: A recent trend for an innovative oral drug delivery system. *Int J Drug Deliv.* 2015;7(2):60-75.
270. Kulkarni AS, Deokula HA, Mane MS, Ghadge GM. Exploration of different polymers for use in the formulation of oral fast dissolving strips. *Int J Curr Pharm Res.* 2010;2(1):33-5.
271. Shelke PV, Dumbare AS, Gadhve MV, Jadhav SL, Sonawane AA, Gaikward DD. Formulation and evaluation of rapidly disintegrating film of amlodipine besylate. *J Drug Deliv Ther.* 2012;2(2):72-5.
272. Çaylı YA. Antibiyotik içeren kuru toz inhaler formülasyonu tasarımı ve permeabilite çalışmaları [Doktora tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2017.
273. Gao L, Zhang D, Chen M. Drug nanocrystals for the formulation of poorly soluble drugs and its application as a potential drug delivery system. *J Nanoparticle Res.* 2008;10(5):845-62.
274. Xie Y, Li G, Yuan X, Cai Z, Rong R. Preparation and In vitro Evaluation of Solid Dispersions of Total Flavones of Hippophae rhamnoides L. *AAPS PharmSciTech.* 2019;10(2):631-40.
275. Elbadawi M, Nikjoo D, Gustafsson T, Gaisford S, Basit AW. Pressure-assisted microsyringe 3D printing of oral films based on pullulan and hydroxypropyl methylcellulose. *Int J Pharm.* 2021;595:120197.
276. Hu H, Jeffrey M, Catchmark M, Demirci A. Effects of pullulan additive and co-culture of *Aureobasidium pullulans* on bacterial cellulose produced by *Komagataeibacter hansenii*. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2022;45(3):573-87.
277. Taşhan E. Nanokristal teknolojisi ile ağızda dağılan tabletlerin geliştirilmesi ve değerlendirilmesi [Doktora tezi]. Ankara: Gazi Üniversitesi; 2017.
278. Karakucuk AE, Celebi N, Teksin ZS. Preparation of ritonavir nanosuspensions by microfluidization using polymeric stabilizers: I. A design of experiment approach. *Eur J Pharm Sci.* 2016;95:111-21.
279. Bresciani M, Magarotto L, Dobetti L. Process of thermodynamical activation of water-insoluble drugs loaded into cross-linked polymers, Patent No: US8889182 B2. U.S Patent and Trademark Office; 2014.
280. Shoormeij Z, Taheri A, Homayouni A. Preparation and physicochemical characterization of meloxicam orally fast disintegration tablet using its solid dispersion. *Braz J Pharm Sci.* 2017;53(4):e00176.
281. Ige PP, Dipsingh SN. Preparation and in vitro–in vivo evaluation of surface-modified poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles as controlled release carriers for flutamide delivery. *J Microencapsul.* 2015;32(3):231-9.
282. Jackson CL, McKenna GB. The melting behavior of organic materials confined in porous solids. *J Chem Phys.* 1990;93(12):9002-11.

283. Teeranachaideekul V, Junyaprasert VB, Souto EB, Müller RH. Development of ascorbyl palmitate nanocrystals applying the nanosuspension technology. *Int J Pharm.* 2008;354(1–2):227-34.
284. Roe KD, Labuza TP. Glass transition and crystallization of amorphous trehalose-sucrose mixtures. *Int J Food Prop.* 2005;8:559-74.
285. Wu J, Zhong F, Li Y, Shoemaker CF, Xia W. Preparation and characterization of pullulan–chitosan and pullulan–carboxymethyl chitosan blended films. *Food Hydrocoll.* 2013;30(1):82-91.
286. Garala K, Joshi P, Shah M, Ramkishan A, Patel J. Formulation and evaluation of periodontal in situ gel. *Int J Pharm Invest.* 2013;3(1):29-41.
287. Borderwala K, Swain G, Mange N, Gandhi J, Lalan M, Singhvi G, et al. Optimization of solid lipid nanoparticles of ezetimibe in combination with simvastatin using Quality by Design (QbD). *Nanosci Nanotechnol - Asia.* 2020;10(4):404-18.
288. Kuroiwa T, Kimura K, Aoki Y, Neves MA, Sato S, Mukataka S, et al. Quantitative evaluation of the effects of moisture distribution on enzyme Induced acylation of trehalose in reduced-moisture organic media. *J Food Res.* 2015;4(5):133-42.
289. Rajagopalan P, Joy TSR. Binding behavior of an artificial sweetener with a natural sugar derivative: Structure and characterization of cyclodextrin complexes of aspartame. *Int J Agric Food Sci.* 2013;3(1):28-33.
290. Langerholc T, Maragkoudakis PA, Wollgast J, Gradisnik L, Cencic A. Novel and established intestinal cell line models—An indispensable tool in food science and nutrition. *Trends Food Sci Technol.* 2011;22:S11- S20.
291. Stenberg P, Luthman K, Artursson P. Virtual screening of intestinal drug permeability. *J Control Release.* 2000; 65(1-2):231-43.
292. Quaroni A, Hochman J. Development of intestinal cell culture models for drug transport and metabolism studies. *Adv Drug Deliv Rev.* 1996;22(1-2):3-52.
293. Billat PA, Roger E, Faure S, Lagarce F. Models for drug absorption from the small intestine: Where are we and where are we going?. *Drug Discov Today.* 2017;22(5):761-75.
294. Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;175(3):880-5.
295. Lennernas H, Palm K, Fagerholm U, Artursson P. Comparison between active and passive drug transport in human intestinal epithelial (Caco-2) cells in vitro and human jejunum in vivo. *Int J Pharm.* 1996;127(1):103-7.
296. Yee S. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man—fact or myth. *Pharm Res.* 1997;14(6):763-6.
297. Kogan A, Kesselam E, Danino D, Aserin A, Garti N. Viability and permeability across Caco-2 cells of CBZ solubilized in fully dilutable microemulsions. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2008;66:1-12.

298. Yazdanian M, Glynn SL, Wright JL, Hawi A. Correlating partitioning and Caco-2 cell permeability of structurally diverse small molecular weight compounds. *Pharm Res.* 1998;15(9):1490-4.
299. Kerleta V, Andrlik I, Braunmiller S, Franke T, Wirth M, Gabor F. Poloxamer 188 supplemented culture medium increases the vitality of Caco-2 cells after subcultivation and freeze/thaw cycles. *Altex.* 2010;27(3):191-7.
300. Sengupta A, Dwivedi N, Kelly SC, Tucci L, Thadhani NN, Prausnitz MR. Poloxamer surfactant preserves cell viability during photoacoustic delivery of molecules into cells. *Biotechnol Bioeng.* 2015;112(2):405-15.
301. Tsoneva I, Iordanov I, Berger AJ, Tomov T, Nikolova B, Mudrov N, et al. Electrodelivery of drugs into cancer cells in the presence of poloxamer 188. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:314213.
302. Nart V, França MT, Anzilaggo D, Riekes MK, Kratz JM, Campos CEM. Ball-milled solid dispersions of BCS Class IV drugs: Impact on the dissolution rate and intestinal permeability of acyclovir. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2015;53:229-38.

8. EKLER

EK-1: Orjinallik Ekran Görüntüsü

TEZ BAŞLIĞI: Hipertansiyon Tedavisinde Etkili Çözünürlük Sorunu Olan Bir Etkin Madde Üzerinde Önformülasyon Çalışmaları

ÖĞRENCİNİN ADI SOYADI: Esra Pezik

DOSYANIN TOPLAM SAYFA SAYISI: 228

Hipertansiyon Tedavisinde Etkili Çözünürlük Sorunu Olan Bir Etkin Madde Üzerinde Önformülasyon Çalışmaları

ORJİNALLİK RAPORU

% **4** BENZERLİK ENDEKSİ % **3** İNTERNET KAYNAKLARI % **1** YAYINLAR % **1** ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 1
2	dspace.gazi.edu.tr İnternet Kaynağı	% 1
3	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	<% 1
4	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
5	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
6	www.acarindex.com İnternet Kaynağı	<% 1
7	acikerisim.pau.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
8	Mayank Kumar Singh, Deep Pooja, Hitesh Kulhari, Sanjay Kumar Jain, Ramakrishna Sistla, Abhay Singh Chauhan. "Poly (amidoamine) dendrimer-mediated hybrid	<% 1

EK-2: Dijital Makbuz

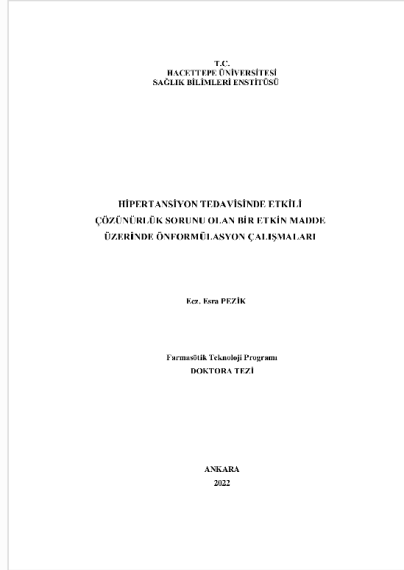


Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Esra Pezik
Ödev başlığı: Doktora Tezi
Gönderi Başlığı: Hipertansiyon Tedavisinde Etkili Çözünürlük Sorunu Olan Bi...
Dosya adı: Esra_Pezik_Doktora_Tezi.docx
Dosya boyutu: 23.18M
Sayfa sayısı: 228
Kelime sayısı: 44,692
Karakter sayısı: 308,894
Gönderim Tarihi: 19-Eyl-2022 12:15ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1903440358



9.ÖZGEÇMİŞ

BİREYSEL BİLGİLER

İsim : Esra Pezik